
STUDIO DEGLI EFFETTI DELL'ESPRESSIONE DI UN GENE VIRALE SULLE RISPOSTE DI DIFESA DELLA PIANTA DI TABACCO

Maria Famiglietti

Dottorato in Scienze Biotechnologiche – XXIII ciclo
Indirizzo Biotechnologie Vegetali
Università di Napoli Federico II



Dottorato in Scienze Biotecnologiche – XXIII ciclo
Indirizzo Biotecnologie vegetali
Università di Napoli Federico II



**STUDIO DEGLI EFFETTI
DELL'ESPRESSIONE DI UN GENE
VIRALE SULLE RISPOSTE DI DIFESA
DELLA PIANTA DI TABACCO**

Maria Famiglietti

Dottoranda: Maria Famiglietti

Relatore: Prof.ssa Rosa Rao

Coordinatore: Prof. Giovanni Sannia

INDICE

1.RIASSUNTO	pag. 1
2.SUMMARY	pag. 3
3.INTRODUZIONE	pag. 7
3.1 Agricoltura moderna e biotecnologie	pag. 7
3.2 Interazione pianta-patogeno	pag. 7
3.2.1 <i>"Plant system immunity"</i>	pag. 8
3.2.2 <i>PTI: Immunità attivata dai PAMPS</i>	pag. 9
3.2.3 <i>Ruolo degli effettori nella soppressione della PTI</i>	pag. 10
3.2.4 <i>R-gene-dependent resistance</i>	pag. 11
3.3 Risposte di difesa ai fitopatogeni	pag. 13
3.4 Sintesi di composti di difesa	pag. 14
3.5 Resistenza sistemica indotta	pag. 15
3.6 Nuovi approcci biotecnologici per incrementare le difese vegetali	pag. 16
3.7 Immunità innata in insetti e mammiferi	pag. 17
3.8 <i>Heliothis virescens-Toxoneuron nigricaps</i>: i geni <i>TnBVank</i>	pag. 19
3.9 Le IκB caratterizzate in pianta	pag. 20
3.10 Scopo della tesi	pag. 21
4.MATERIALI E METODI	pag. 22
4.1 Descrizione dei materiali	pag. 22
4.1.1 <i>Analisi della sequenza di <i>TnBVank1</i></i>	pag. 22
4.1.2 <i>Allevamento del materiale vegetale</i>	pag. 22
4.2 Caratterizzazione molecolare	pag. 23
4.2.1 <i>Estrazione dell' RNA</i>	pag. 23
4.2.2 <i>RT-PCR</i>	pag. 23
4.2.3 <i>Estrazione delle proteine totali da tessuti vegetali</i>	pag. 24
4.2.4 <i>SDS-PAGE e analisi western blotting</i>	pag. 24
4.2.5. <i>Electroblotting e Western Blot</i>	pag. 24
4.3 Immunolocalizzazione della proteina in protoplasti di tabacco	pag. 25
4.3.1 <i>Isolamento dei protoplasti</i>	pag. 25
4.3.2 <i>Immunolocalizzazione con metodo DAB e a fluorescenza</i>	pag. 25
4.4 Saggi biologici con spore di <i>Botrytis cinerea</i>	pag. 26
4.5 Saggi biologici con <i>Heliothis virescens</i>	pag. 26
4.6 Analisi microarray	pag. 26
4.6.1 <i>Induzione della SAR e produzione delle reazioni di ibridazione</i>	pag. 26
4.6.2 <i>Disegno del "chip" e ibridazione</i>	pag. 27
4.6.3 <i>Analisi bioinformatica</i>	pag. 27
4.7 Analisi Real Time RT-PCR	pag. 28
4.7.1 <i>Disegno dei primers</i>	pag. 28
5.RISULTATI	pag. 30
5.1 Analisi della sequenza <i>TnBVank1</i> e omologie in banca dati	pag. 30
5.2. Caratterizzazione molecolare delle piante transgeniche	pag. 31
5.2.1 <i>Analisi RT-PCR</i>	pag. 31
5.2.2 <i>Analisi western blotting degli estratti proteici totali delle piante transgeniche</i>	pag. 32
5.3 Immunolocalizzazione della proteina virale in protoplasti di tabacco	pag. 33
5.4 Saggi biologici con larve di <i>Heliothis virescens</i>	pag. 34

5.5 Biosaggi di resistenza al fungo fitopatogeno <i>Botrytis cinerea</i>	pag. 34
5.6 Induzione della resistenza sistemica acquisita	pag. 35
5.7 Controllo qualità dell'RNA e estrazione dei dati microarray	pag. 36
5.8 Analisi microarray	pag. 37
<i>5.8.1 Geni differenzialmente espressi nelle piante "wild type" trattate con capsiceina</i>	pag. 37
<i>5.8.2 Geni differenzialmente espressi nelle piante transgeniche trattate con capsiceina</i>	pag. 38
<i>5.8.3 Confronto tra ESTs differenzialmente espresse</i>	pag. 39
5.9 Validazione di geni differenzialmente espressi tramite Real Time RT-PCR	pag. 41
6.DISCUSSIONI	pag. 43
7.CONCLUSIONI	pag. 50
8.BIBLIOGRAFIA	pag. 51
APPENDICE	pag. 66

1. RIASSUNTO

Toxoneuron nigriceps è un parassitoide endofago degli stadi larvali del lepidottero *Heliothis virescens* ed è associato simbioticamente al polydnavirus *TnBV*, iniettato nell'ospite al momento dell'ovideposizione. L'espressione nella larva parassitizzata dei geni virali gioca un ruolo importante nella soppressione della risposta immunitaria e nell'alterazioni dell'equilibrio ormonale dell'ospite. Alcuni dei geni coinvolti nella parassitizzazione, e i corrispondenti profili di espressione, sono stati caratterizzati ed il sequenziamento dell'intero genoma del virus è stato completato. Tale sistema biologico offre una opportunità straordinaria di comprensione dei complessi processi fisiologici che regolano le interazioni ospite-parassitoide ed inoltre apre nuove opportunità nell'identificazione di molecole ad attività biopesticida e quindi di rilevante potenzialità per controllo degli insetti fitopatogeni. Una delle famiglie geniche identificate nel polidnavirus, è caratterizzata da domini ankirina che mostrano alta similarità alle IκB umane e di insetto coinvolte nel *signaling* NFκB (Falabella *et al.*, 2007). È stato dimostrato che i prodotti IκB virali legano nel citoplasma fattori trascrizionali NFκB/Rel mascherandone i segnali di localizzazione nucleari e impedendone dunque la funzione di regolatori positivi della difesa immunitaria. Il ruolo chiave in particolare di *TnBVank1* nel complesso *pathway* di alterazioni fisiologiche in *Heliothis virescens* ne ha supportato l'espressione in tabacco per verificarne l'attività insetticida e gli effetti sul sistema di difesa vegetale.

Piante transgeniche di tabacco che esprimono costitutivamente il gene virale sono disponibili presso il laboratorio dove è stata svolta l'attività di tesi.

La caratterizzazione molecolare ha confermato la trascrizione e la traduzione di *TnBVank1* in *Nicotiana tabacum* ed ha mostrato un caratteristico *pattern* multibanda in western blotting, indice di una possibile interazione della proteina con prodotti endogeni di pianta. Questa ipotesi è compatibile con la struttura di *TnBVANK1* che presenta un dominio ankirina molto esteso, costituito da tre ripetizioni, coinvolto ubiquitariamente nelle interazione proteina-proteina. Allo scopo di valutare la localizzazione della proteina ricombinante nella cellula vegetale, sono stati allestiti esperimenti di immunolocalizzazione su protoplasti isolati da foglie delle linee transgeniche. Le immagini ottenute tramite microscopia confocale mostrano che la proteina ricombinante è associata alle membrane cellulari. Questo risultato concorda con quanto osservato per AKR2, una IκB-like di *Arabidopsis*, che interagisce con alcune proteine esterne della membrana dei cloroplasti e per BIANK1 di riso che è associata alla membrana plasmatica (Bae *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). Biosaggi di resistenza a *Heliothis virescens*, ospite naturale del *Toxoneuron nigriceps*, sono stati condotti in collaborazione con il Dipartimento di Biologia, Difesa e biotecnologie Vegetali dell'Università di Potenza. I saggi biologici con il lepidottero hanno evidenziato che la presenza del prodotto transgenico all'interno dei tessuti vegetali causa un rallentamento significativo nello sviluppo delle larve che raggiungono il loro massimo incremento ponderale con un ritardo sostanziale rispetto agli insetti controllo. Per verificare un'applicazione del gene virale nella difesa a più ampio spettro è stata investigata l'interazione delle piante transgeniche con il patogeno fungino *B. cinerea*. Tale biosaggio ha rilevato una maggiore suscettibilità delle linee transgeniche al fungo rispetto i controlli.

Per comprendere quali cambiamenti nel profilo trascrittomico delle piante transgeniche rispetto alla *wild type* interferiscano con l'accrescimento delle larve di *Heliothis* e determinino suscettibilità a *Botrytis cinerea*, sono stati condotti esperimenti microarray con tecnologia Combimatrix. L'analisi trascrittomica ha rivelato che le piante transgeniche trattate con capsiceina, un elicitore che mima

l'attacco fungino, accumulano i trascritti di due inibitori di proteasi (*PIN1* e "*kunits type inhibitor*"), la cui attività antimetabolica nei confronti dei fitofagi è già stata ampiamente dimostrata in letteratura (Senthilkumar *et al.*, 2010). Tale evidenza potrebbe spiegare i risultati ottenuti dai saggi biologici con le larve del lepidottero. Tuttavia il ritardo di crescita osservato nel saggio biologico potrebbe essere in parte anche dovuto ad un effetto diretto della proteina eterologa sulla larva di *H. viruens*, assumendo che la proteina viene in parte assorbita in maniera sufficientemente integra per esplicitare una funzione biologica analoga a quella che si osserva nelle larve parassitizzate.

Dall'analisi microarray inoltre è emerso che le piante transgeniche mostrano la sottoespressione di settantadue geni rispetto alla *wild type*.

L'annotazione funzionale delle ESTs ha evidenziato che un considerevole numero di geni è associato al rimodellamento della parete cellulare. In particolare, uno dei geni chiave della biosintesi dei monolignoli (*Caffeato 3-O-metiltransferasi, comt*) e di numerosi altri geni coinvolti nella biosintesi-turnover della parete cellulare (cellulasi, poligalatturonasi, pectinmetilesterasi, proteine ricche di cisteine) sono sottoespressi nel transgene. Modificazione della parete cellulare, come ad esempio apposizioni di lignina, possono rafforzare tale barriera e il ruolo della parete risulta determinante nel contenimento degli attacchi di funghi fitopatogeni dotati di meccanismi di penetrazione attiva, tra i quali proprio *B. cinerea* (Asselbergh *et al.*, 2007). È quindi ipotizzabile che la ridotta espressione di numerosi geni riduca il rafforzamento della parete cellulare dei tessuti transgenici a seguito dell'azione del fungo favorendone la diffusione nell'ospite. Per verificare tale ipotesi sarebbe necessario analizzare la composizione e la struttura della parete cellulare nelle piante transgeniche in seguito ad infezione.

In conclusione, l'espressione del gene *TnBVank1* in piante di tabacco altera significativamente la risposta molecolare della pianta a seguito di differenti condizioni di stress biotico, instaurando condizioni non sempre favorevoli per la protezione della pianta. Tuttavia, l'incremento della resistenza all'attacco di larve di *H. virescens* osservata nelle piante che esprimono la proteina virale, rappresenta un interessante risultato che conferma che molecole derivate dai parassitoidi possono essere utili per lo sviluppo di nuove strategie di protezione delle colture (Gill *et al.* 2006; Maiti *et al.*, 2003).

Inoltre tale studio conferma che l'espressione eterologa rappresenta un potente strumento per lo studio funzionale di nuove molecole potenzialmente utili per la protezione delle colture dagli stress biotici.

2.SUMMARY

Parasitoids are insect parasites of other insect species that ultimately kill their host, either by physiological manipulation and induction of host developmental arrest or by physiological consumption of host tissue (Beckage and Gelman, 2004). The study of the molecular strategies used by parasitoid to control host could be a source of new insecticidal compounds (Pennacchio and Strand, 2006).

Toxoneuron nigriceps is an endophagous parasitoid of larval stages of the tobacco budworm *Heliothis virescens*. This hymenopteran parasitoid is associated with a polydnavirus (*TnBV*, *Toxoneuron nigriceps* Bracovirus) that is injected in the host with eggs at the moment of oviposition. Parasitized *H. virescens* larvae are developmentally arrested and show a complex array of pathological symptoms ranging from the suppression of the immune response to an alteration of ecdysone biosynthesis and metabolism. Most of these pathological syndromes are induced by the expression of genes of polydnavirus associated with *Toxoneuron* (Malva *et al.*, 2004). The entire genome of the *TnBV* is sequenced and its expression profile during the parasitization cycle is under investigation. The study of *TnBV* genes offers, in fact, a good opportunity to better understand the complex physiology of host-parasitoid interactions, but also to open new perspectives in the development of molecules that could be exploited for pest control. *TnBV* is a typical polydnavirus, showing a segmented genome, made of circular dsDNA molecules, which range in size from 2.5 kb to >32 kb (Malva *et al.*, 2004).

The sequencing of the viral genome has allowed the identification of a gene family characterized by the presence of two ankyrin repeats. Three related small Open Reading Frames, codifying proteins ranging between 155 and 194 aa, were found and named *TnBVANK* proteins, which have significant homology with I κ B proteins of insects and mammals (30% of identity with Cactus, the I κ B involved in the Toll-defense pathway of *Drosophila*) (Falabella *et al.*, 2007). These proteins regulate multiple cellular responses activated by the nuclear import of various NF- κ B/Rel proteins and play an important role in the negative regulation of immune system in many animals (Hoffmann, 2003). *TnBV* proteins have shorter ankyrin domains and do not possess the PEST and SRD domains regulating I κ B signal-mediated degradation and turnover. Starting from a few hours after parasitization, the transcripts of these ank genes were detected, at different levels, in several host tissues (Falabella *et al.*, 2007). These results strongly suggests that in parasitized host larvae, *TnBVANK* proteins determine the sequestration of NF- κ B/Rel factors in the cytoplasm, likely contributing to the suppression of the immune response (Falabella *et al.*, 2007). The molecular features of *TnBVank1* and its expression profile indicate a possible role of this gene in the disruption of the host antimicrobial response and in the alteration of capsule formation by regulating hemocyte proliferation (Falabella *et al.*, 2007).

The alignment of *TnBVank1* with *Arabidopsis thaliana* proteins showed a good similarity to the ankyrin protein AKR2 (Yan *et al.*, 2002) which contains 4 ankyrin domains and seems to be involved in the regulation of hydrogen peroxide levels during biotic and abiotic stresses by optimizing the ascorbate peroxidase 3 (APX3) hydrogen peroxide-degrading activity. Similarly, the homologue of AKR2 in tobacco ANK1 is also involved in defence response, by interaction with a transcriptional factor belonging to bZIP family (Kuhlmann *et al.*, 2003). The protein NPR1 has also been described as I κ B-like (Maleck and Lawton, 1998). The *NPR1* gene encodes a protein containing an ankyrin repeat domain and a BTB/POZ (*broad-complex, tramtrack*, and *bricà-brac* /poxvirus, zinc finger) domain (Cao *et al.*, 1998), both of which are

involved in protein–protein interactions (Michaely and Bennet, 1992). NPR1 is a key regulator of SAR-related *PR* gene expression in the model plant *Arabidopsis*. The mutants of the gene have lost the expression of SA-induced *PR* genes, SAR and some resistance (*R*) gene mediated resistance (Friedrick *et al.*, 2001). Over-expression of *NPR1* enhances resistance to diverse pathogens, including bacteria and fungi, in a dosage-dependent manner in *Arabidopsis* (Chern *et al.*, 2005; Makandar *et al.*, 2006). NPR1 is localized in the cytosol and disulfide bonding between Cys residues results in the formation of a stable, high molecular weight oligomer. Upon pathogen challenge, accumulation of SA triggers transient cellular reduction that is sensed by Cys residues of the NPR1 oligomer. This transient redox change reduces NPR1 disulfide bonds, resulting in the release of NPR1 monomer that translocates to the nucleus to activate gene transcription (Moore *et al.*, 2011).

Such a key role of *TnBVank1* gene in the complex arrays of physiological and developmental alterations caused in the host and the interesting homologies with plant proteins encouraged its expression in tobacco as candidate in a new perspective of pest control.

Transgenic plants constitutively expressing *TnBVank1* have been obtained in the laboratory where this project has been carried out and the gene sequence had been fused to the signal peptide of KDEL sequence to ensure the accumulation and stability of heterologous protein (Petrucelli *et al.*, 2006). Transgenic tobacco plants were fully characterized by PCR and western blotting which confirmed the expression of the recombinant protein often complexed with other proteins through bonds perhaps due to stable interactions among *TnBVANK1* and other cell proteins. By bioinformatic tool, viral protein shows sites of Sumoylation (SUMO: small ubiquitin-related modifier) that is a reversible post-translational modification regulated by environmental stimuli in animals and yeasts (Johnson, 2004).

To know the localization of heterologous protein in plant cell, immunolocalization by confocal microscopy on plant protoplasts shows that *TnBVANK1* was associated with cellular membranes. This result is similar to localization reported for AKR2 which interact with OEP7, a chloroplast outer envelope protein 7 (Bae *et al.*, 2008). The association with plasma membrane is also reported for OsBIANK1, a rice ankyrin protein (Zhang *et al.*, 2010).

In order to assess the effects of such genetic manipulation on plant-pest interactions, bioassays against *Heliothis virescens*, the natural host of *Toxoneuron nigriceps*, were carried out that showed that *larvae* reared on transgenic tissues undergo a delayed development in comparison with controls, suggesting a possible anti-metabolic effect occurred in plants following up the transgene expression. On the contrary, bioassay with the phytopathogen *Botrytis cinerea* spores produced larger damage on transgenic plants than on control indicating a higher susceptibility to the fungus in the plant tissues enriched with TnBV protein. To investigate the effects of heterologous expression of *TnBVank1* gene on plant transcriptome that have determined two different responses to herbivore or phytopathogen attack, microarray experiments has been performed with Combimatrix technology using Tobacco chip 10K at Plant Genome Center of Verona University.

Transgenic and control plants have been treated on the stem with capsicein, a elicitor isolated from *Phytophthora capsici* to mimic pathogen attack following protocol published by Bonnet *et al.*, 1996. Microarray analysis has been performed on RNA isolated from control plants not treated, control plants and transgenic plants treated with capsicein. The tobacco ESTs that are differentially expressed in microarray

analysis are converted to Arabidopsis orthologous genes as more functional annotations are available for the genes of the crucifer.

Firstly, the expression profile of wild type elicited has been analyzed to verify the correct induction of defence-gene related. This analysis have revealed the over-expression of high number of ESTs (90) and the down-regulation of 36 ESTs. The correct activation of defence response has been evidenced by functional annotation performed by BLAST2GO. In wild type plants, in fact, after elicitation with capsicein are up-regulated 13 genes directly involved in defence (*PR* genes, *chitinase*, *proteinase inhibitors*, *defensin-like proteins*), 11 genes involved in oxidative burst (*l-ascorbate peroxidase*, *cytochrome p450-like protein*, *nadh dehydrogenase*), 6 transcriptional factors (*platz transcription factor*, *nac protein*), 4 gene involved in cell wall remodeling (*cellulase*, *pectin methylesterase*, *cysteine-rich protein beta-glucanase*), two clathrin protein, involved in packaging secretory proteins into small vesicles. In particular, the accumulation of *PR* transcripts and genes involved in ROS synthesis confirms the correct activation of defence response (van Loon *et al.*, 2006). The analysis of ESTs modulated in transgenic plants elicited, in stead, shows that the up-regulation of 18 ESTs and a elevated number (72) ESTs down-regulated.

Between the up-regulated genes in transgenic plants, there are two proteinase inhibitor (*PIN1* and *KNT* “*kunits type inhibitor*”), which play an important role in defence against insect inhibiting digestive enzymes of attacking pests (Koiwa *et al.*, 1997). The heterologous expression in tobacco plants both potato *PIN1* and soyabean *KNT* increases resistance to insect herbivore (Ussuf *et al.*, 2001)

A quantitative Real Time PCR analysis confirmed that *PIN1* is 7 times overexpressed in transgenic plants. This evidence could explain the delayed development of *larvae* feed with transgenic leaves. At same time, it could also be hypotized that the ankyrin domain present in viral protein could block the nutrients uptake. It is also possible that a small part of viral protein could overcome peritrophic membrane and reach emocelic targets. All these theories will be confuted analyzing the effects of feeding of budworm with transgenic leaves.

The functional annotation of ESTs in transgenic plants treated with capsicein has reveled the down-regulation of numerous genes involved in cell wall remodeling: one key gene of lignin biosynthesis (*caffeic acid 3-O-methyltransferase*, *comt*), three gene involved in oxidative burst (*cytochrome c-type*, *protein 2og-fe oxygenase family protein*, *nadh dehydrogenase 18*) and numerous genes that code enzyme involved in cell wall biosynthesis (*glycosyl hydrolase family 9*, *pectin methylesterase cysteine-rich protein polygalacturonase-like protein*). This evidence could explain the susceptibility of transgenic lines to *Botrytis cinerea* since a lower concentration of lignin could determinate a minor fortification of cell wall and in this way this could allow the spreading of necrotrophic pathogen in transgenic cell as reported in wheat against powdery mildew invasion (Bhuiyan *et al.*, 2009). At same time also the down-regulation of gene involved in oxidative burst could contribute to susceptibility to Botrytis, as it is reported that timely hyperinduction of H₂O₂-dependent defenses in the epidermal cell wall can effectively block early development of *B. cinerea* (Asselbergh *et al.*, 2007). To verify these ipotesys, it could be useful analysis the composition of cell wall during transgenic plant-Botrytis interaction.

Deeper analysis by comparing expression profile of modulated ESTs have underlined that forty-seven genes down-regulated in transgenic plants are normally up-regulated in wild type after elicitation with capsicein. The down-regulation of large number of genes may be the consequence of interference of viral protein in activation of plant immunity, as reported in Heliothis where TnBV ANK proteins cause retention of NF-

κ B/Rel factors in the cytoplasm and may thus contribute to suppression of the immune response in parasitized host *larvae*. An approach of mass spectrometry seems to be the best tool to identify the potential transcriptional factor that interact with viral TnBVANK1 protein.

In conclusion, this project confirm that molecules isolated from parasitoid could be useful to develop new strategies to protect crops from pest as already shown in literature (Gill *et al.* 2006; Maiti *et al.*, 2003). The expression heterologous in plant represent a valid tool to identify new genes for pest control and it could help to characterize role and functionality of new isolated genes.

3. INTRODUZIONE

3.1 Agricoltura moderna e biotecnologie

Numerosi fattori di natura biotica e abiotica sono causa di scadimenti qualitativi e di perdite produttive dei prodotti vegetali, sia in pre- che in post-raccolta. In particolare, è stato stimato che agenti fitopatogeni causano annualmente perdite nelle produzioni agricole mondiali del 20-40% (Ronald e Adamchack, 2008). Il contenimento di tali perdite risulta necessario non solo per garantire un adeguato reddito agli operatori del settore agricolo ma anche per far fronte alle crescenti esigenze alimentari della popolazione mondiale, che è in continua espansione (è previsto che, entro le prossime quattro decadi, si raggiungerà il picco di dieci miliardi d'individui) (Slater *et al.*, 2003).

Attualmente, la lotta ai fitopatogeni si basa principalmente sull'utilizzo degli agrofarmaci tuttavia il pericolo di selezione di ceppi fungini o batterici resistenti all'impiego di alcuni principi attivi, la revoca dell'autorizzazione all'impiego di alcuni di essi e la crescente sensibilità dell'opinione pubblica nei confronti delle tematiche ecotossicologiche e della salute umana connessa all'impiego degli agrofarmaci, hanno portato ad un incremento delle ricerche inerenti approcci di difesa alternativi a quello chimico (Quaglia *et al.*, 2011). Una delle alternative da sempre considerata tra le più promettenti riguarda l'impiego della resistenza genetica delle piante. L'introduzione di geni di resistenza in una specie vegetale può avvenire sia mediante il miglioramento genetico tradizionale che attraverso l'ingegneria genetica. Il miglioramento genetico tradizionale prevede programmi d'incrocio fra due piante selezionate (il parentale donatore scelto per il fattore di resistenza e il parentale ricorrente selezionato per il suo genoma di base) e successivi programmi di reincrocio per diluire o minimizzare i tratti indesiderati. Questa tecnica prevede un lungo lavoro di selezione e un numero piuttosto elevato di generazioni di reincrocio, per cui i tempi per l'ottenimento dell'ideotipo si dilatano notevolmente anche avvalendosi del supporto dei marcatori molecolari (Gust *et al.*, 2010). La manipolazione genetica dei genomi vegetali rappresenta una valida alternativa per introgredire nel genoma della pianta nuovi geni ed ottenere così una resistenza a più ampio spettro e, in alcuni casi, più durevole. Il sequenziamento di genomi di alcune specie vegetali, lo studio dei trascrittomi e i nuovi lavori scientifici sull'interazione pianta-patogeno hanno incrementato la comprensione dei meccanismi d'infezione microbica e di tutta quella serie di alterazioni metaboliche e fisiologiche, successive al processo infettivo, che nel loro complesso costituiscono la cosiddetta immunità vegetale o "Plant Immunity". Tali conoscenze rappresentano una fonte importante per l'individuazione di nuovi geni potenzialmente utili per la protezione delle colture.

3.2 Interazione pianta-patogeno

In base alla datazione dei fossili, le prime piante si sono stabilite sulla terra ferma circa 480 milioni di anni fa e il loro insediamento è stato facilitato dalle associazioni con funghi simbiotici (Gerhig *et al.*, 1996). L'evoluzione delle piante e i meccanismi di difesa da esse adottati non sono altro che il risultato della continua interazione con microrganismi epifiti, simbiotici e fitopatogeni (Chrisholm *et al.*, 2006). Il successo dell'evoluzione e dello sviluppo delle piante attualmente conosciute dipende anche dall'abilità che esse hanno nel riconoscere i microrganismi patogeni e nell'attivare rapidamente valide risposte di difesa. Sia nell'ambiente naturale sia negli agro-ecosistemi, infatti, le piante sono continuamente esposte all'attacco di parassiti che ne danneggiano i tessuti, sottraggono risorse energetiche e ne alterano la fisiologia e,

spesso la struttura morfoanatomica. Per limitare il danno inflitto da parassiti, le piante hanno sviluppato meccanismi di difesa costitutivi e/o inducibili. Le difese costitutive, dette anche passive o pre-infezionali, sono quelle possedute dalla pianta indipendentemente dall'interazione con il patogeno. I tricomi, la cuticola, la parete cellulare e composti antimicrobici come saponine, glucosidi cianogenetici, glucosinolati, polifenoli o fenilpropanoidi rappresentano una protezione costitutiva della pianta, ad azione non-specifica nei confronti di un'ampia gamma di patogeni (González-Lamothe *et al.*, 2009). Invece, le difese indotte, dette anche attive o post-infezionali, sono attivate nell'ospite a seguito dell'interazione con il patogeno e del suo riconoscimento.

Qualora le difese costitutive fossero sufficienti a contrastare l'inizio del processo infettivo, la pianta viene definita come “non ospite” del patogeno. È invece definita pianta “ospite” rispetto ad un patogeno quella in cui le barriere costitutive non sono capaci di bloccare l'instaurarsi del processo infettivo.

La pianta ospite può essere suscettibile, resistente o tollerante rispetto ad un patogeno. La pianta è suscettibile quando non è in grado di contrastare il patogeno, dall'interazione col quale scaturisce una malattia (reazione di compatibilità). La pianta è tollerante quando è in grado di contenere i danni prodotti dall'infezione. Infine la pianta è definita resistente quando è in grado di riconoscere il patogeno e di attivare contro di esso una serie di meccanismi di difesa post-infezionali. In contrasto con la resistenza generale, tipica delle piante non ospiti, la resistenza delle piante ospiti è detta anche “resistenza specifica o varietale”.

Secondo la teoria del gene per gene di Flor (1955), nella resistenza specifica il riconoscimento pianta-patogeno è mediato dall'interazione tra il prodotto di un gene di resistenza (*R*) della pianta ospite (il recettore), ed il prodotto di un gene di avirulanza (*avr*) del patogeno, che codifica per un elicitore specifico. Infatti, la resistenza specifica dell'ospite è spesso controllata da un singolo gene di resistenza (*R*) il cui prodotto interagisce, direttamente o indirettamente, con l'elicitore specifico del patogeno (Hammond-Kosack e Jones, 1996). Se il gene di resistenza e di avirulenza sono entrambi dominanti ed omologhi (*R* x *Avr*), allora avviene il riconoscimento pianta-patogeno e la reazione che si sviluppa è di tipo incompatibile. Se, pur essendo omologhi, uno od entrambi i geni sono recessivi non avviene il riconoscimento e si sviluppa una reazione di tipo compatibile. A seguito del riconoscimento è attivata una cascata di eventi metabolici che si conclude con l'attivazione dei meccanismi di difesa post-infezionali.

E' necessario precisare che alcuni elicitori (elicitori generali) sono coinvolti in risposte anche nella resistenza non ospite o generale.

3.2.1 “Plant system immunity”

Secondo quanto riportato da Jones e Dangl (2006), il riconoscimento pianta-patogeno e la messa in atto delle risposte difensive della pianta può essere schematizzato in quattro fasi fondamentali che, nel loro complesso, rappresentano il così detto “Plant immunity system” (Fig.1). Tale schema illustra bene la co-evoluzione pianta-patogeno e, dunque, il succedersi della selezione di caratteri di resistenza nell'ambito della popolazione vegetale, il loro superamento da parte della popolazione microbica, la selezione di nuovi caratteri di resistenza della pianta e così via, in una sempiterna lotta che vede come controparti, appunto, la pianta ed il patogeno.

In particolare, nella prima fase, i PAMPS (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*), componenti essenziali della strutture cellulari estremamente conservati in molti

microrganismi (ad esempio la flagellina batterica e la chitina fungina), sono riconosciuti dai recettori vegetali PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), che attivano le risposte di difesa bloccando la colonizzazione. Tale risposta è definita come PTI (*PAMP Triggered Immunity*). Nella seconda fase, nella popolazione dei fitopagani si evolvono biotipi caratterizzati da nuovi fattori di virulenza che interferiscono con la PTI. Nella terza fase, uno dei fattori di virulenza del patogeno è specificamente riconosciuto dalle proteine R, attivando le risposte di difesa definite come ETI (*Effector-Triggered Immunity*). Generalmente ETI e PTI attivano lo stesso tipo di risposte, sebbene l'ETI sia una versione più rapida e amplificata e nelle interazioni incompatibili pianta-patogeno può portare al manifestarsi della reazione di ipersensibilità (*Hypersensitive Response* o HR). Nell'ultima fase, la selezione naturale guida i patogeni a superare il riconoscimento dei prodotti dei geni R, diversificando i propri fattori di virulenza o producendone altri che sopprimono l'ETI (Jones e Dangl., 2006). In genere la PTI è attiva nei confronti dei patogeni non propri (not-self o eterologhi) di quell'ospite ed è dunque coinvolta nella resistenza non ospite o generale (*Non Host Resistance*), mentre l'ETI, attiva nei confronti dei patogeni propri (self o omologhi) di quell'ospite, è coinvolta nella resistenza ospite o specifica (*Host Resistance*).

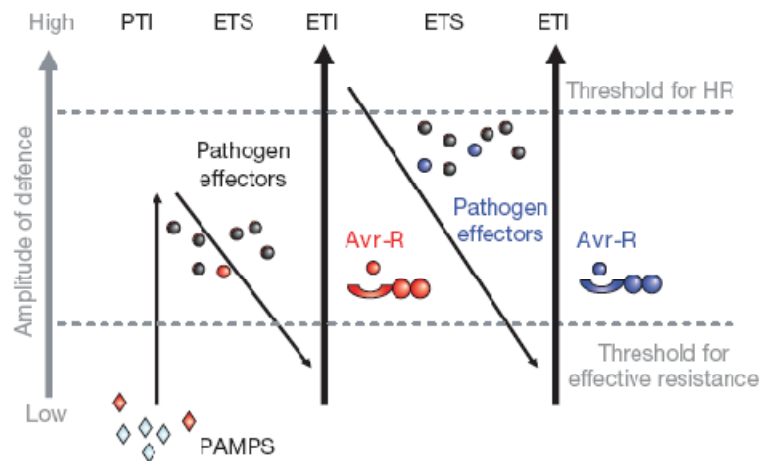


Fig.1. Modello a zigzag “plant immunity system” (modificato da Jones e Dangl, 2006)

3.2.2 PTI: immunità attivata dai PAMPS

La PTI è innescata nelle prime fasi dell'interazioni pianta-patogeno dai recettori trans membrana PRRs che hanno interagito con gli elicitori generali (PAMPS). Nello specifico, con il termine PAMPS, che fu coniato nel 1997 da Medzhitov e Janeway, sono indicate quelle molecole che possono fungere da elicitori e che sono prodotte dal metabolismo primario del microrganismo patogeno come, ad esempio, polipeptidi, glicoproteine, lipopolisaccaridi dei batteri Gram-negativi e peptidoglicani dei batteri Gram-positivi, frammenti di DNA batterici, proteine capsidiche di fitovirus, eptaglicani della parete degli oomiceti. In sintesi, i PAMPS possono essere anche indicati come elicitori generali esogeni. Azione assimilabile ai PAMPS è attribuita ai MIMPS (*Microbe Induced Molecular Patterns*), indicati anche come elicitori generali endogeni, che derivano dall'azione litica di enzimi prodotti dai microrganismi fitopatogeni sulle strutture vegetali. MIMPS sono, ad esempio, gli oligogalatturonidi liberati dalla lamella mediana delle cellule vegetali in seguito all'azione di enzimi litici prodotti da *Botrytis cinerea* (Mackey e McFall, 2006). L'ipotesi che tutti i PAMPS possano essere riconosciuti da tutte le specie vegetali è stata in parte superata. Infatti, l'elicitore batterico EF-Tu (Elongation Factor Thermo Unstable) è riconosciuto

infatti solo da specie appartenenti alla famiglia delle *Brassicaceae* (Zipfel *et al.*, 2006) mentre il riconoscimento di una proteina batterica cold-shock avviene solo nelle *Solanaceae* (Felix e Boller, 2003).

È stato dimostrato che la componente chiave della PTI è la proteina BAK1 (*Brassinosteroid Insensitive1-associated kinase 1*), anche nota come SERK3 (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 3*), appartenente a una famiglia di cinque recettori che sono importanti regolatori di RLKs coinvolti sia nella risposta immunitaria che in vari processi di sviluppo (Heese *et al.*, 2007). Infatti, molti dei recettori PRRs richiedono per la propria attività BAK1, che è un co-recettore importante per la percezione del PAMP. Dopo 30-60 secondi dall'elicitazione, i recettori PRRs e BAK1 sono fosforilati e si complessano in eterodimeri attivando la PTI (Schulze *et al.*, 2010).

L'archetipo dell'elicitore generale, attivatore delle risposte basali, è la flagellina batterica. Prove effettuate con un frammento pepetidico di sintesi costituito da 22 amminoacidi e appartenente ad un dominio conservato della proteina (flg22) è sufficiente a indurre l'attivazione di circa 1100 geni in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Zipfel *et al.*, 2004). Responsabile del riconoscimento in pianta della flagellina è il recettore FLS2 (Chincilla *et al.*, 2006), che mostra delle strutture modulari simili ai recettori Toll di *Drosophila* e TLR5 (*Toll-like receptor 5*) negli animali (Gomez-Gomez e Boller, 2000). L'interazione tra FLS2 e flg22 induce risposte di difesa che bloccano le infezioni di *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, mentre mutanti di *Arabidopsis* che mancano del gene *fls2* sono suscettibili al batterio (Zipfel *et al.*, 2004). Il dominio extracellulare LRR (*Leucine Rich Domain*) è responsabile del riconoscimento di fls22 e una singola mutazione puntiforme all'interno del dominio LRR di FLS2 blocca l'interazione con l'elicitore flg22. Sebbene non ci sia similarità nella sequenza amminoacidica del dominio extracellulare dei recettori FLS2 e TLR5, l'utilizzo degli stessi moduli biochimici per il riconoscimento dei PAMPS come il dominio LRR è il risultato di un'evoluzione convergente (Hayashi *et al.*, 2001).

3.2.3 Ruolo degli effettori nella soppressione della PTI

Gli effettori sono sostanze prodotte per lo più da batteri che, immesse direttamente all'interno della cellula ospite mediante un sistema di secrezione di tipo III (*Type III Secretion System* o TTS), fungono da elicitori specifici (Cunnac *et al.*, 2009). È noto, comunque, che nelle piante prive del recettore, gli effettori possono fungere anche da fattori di virulenza, sopprimendo le difese della pianta mediante l'inibizione della trasduzione del segnale, della trascrizione o nelle modifiche post-traduzionali (Alfano e Collmer, 2004).

Alcuni patogeni riescono a sopprimere le risposte PTI e quindi moltiplicarsi attraverso l'espressione degli effettori. In bibliografia è riportato che ogni ceppo di fitopatogeni sintetizza dai 20 ai 30 effettori e pertanto il repertorio degli effettori è molto vasto e varia spesso anche tra ceppi batterici appartenenti alla stessa specie ed il loro ruolo è ridondante e intercambiabile (Kvitko *et al.*, 2009).

Gli effettori AvrPto e AvrPtoB isolati da *P. syringae* pv. *tomato* hanno entrambi come obiettivo il complesso FLS2-BAK1, poiché contribuiscono alla virulenza inibendo gli "step" iniziali della PTI alterando le risposte di difesa coinvolte nell'accumulo di callosio nella parete cellulare dell'ospite (Hauck *et al.*, 2003).

Molto meno numerosi sono gli effettori di origine eucariotica descritti in letteratura. Sia oomiceti che funghi producono effettori che sono secreti attraverso le membrane e successivamente veicolati nelle cellule dell'ospite con meccanismi non ancora del tutto noti (Kamoun, 2007). È stato riportato il ruolo di alcuni effettori nella

soppressione dell'immunità. Ad esempio, Avr3a di *Phytophthora infestans* attraverso l'interazione con la proteina CMPG1 (U-box E3 ligasi) dell'ospite, blocca la morte cellulare programmata (Bos *et al.*, 2010).

Anche tra i nematodi fitopatogeni sono stati identificati alcuni potenziali effettori proteici, responsabili dell'interazione con i tessuti dell'apparato radicale e dello sviluppo di nuove strutture cellulari con funzione trofica. L'analisi proteomica della saliva del nematode *Meloidogyne incognita* ha identificato circa 486 potenziali effettori coinvolti nella rimodulazione dell'espressione genica nell'ospite (Bellafiore *et al.*, 2008).

3.2.4 “R-gene-dependent resistance”

La co-evoluzione tra pianta e patogeno ha determinato la comparsa in pianta di proteine che riconoscono in modo specifico gli elicitori specifici, compresi gli effettori, secondo la teoria del gene per gene (Flor, 1955). Il riconoscimento intracellulare degli effettori del patogeno è mediato da una classe di recettori proteici codificati dai geni *R*. Tali geni sono stati isolati da diverse specie e determinano resistenza a patogeni virali, batterici e fungini oltre che a nematodi e insetti (Martin *et al.*, 2003). Nella Fig.2 sono elencati i principali geni *R* e i relativi domini strutturali. L'immunità mediata dai geni *R* riconduce all'immunità acquisita degli animali, con la differenza che nel regno animale è mediata da cellule specializzate (macrofagi, cellule dendritiche, neutrofili) mentre nel regno vegetale ogni singola cellula è in grado di riconoscere la presenza del patogeno. La maggior parte dei geni *R* codificano per recettori caratterizzati da un sito di legame nucleotidico (NBS) e un dominio ricco di ripetizioni di leucina (LRR). Le proteine NBS-LRR possono essere classificate in due gruppi, che sono distinti per la presenza o meno del dominio TIR, omologo al “*Toll and Interleukin-1 receptor*”, responsabile della trasduzione del segnale (Hulbert *et al.*, 2001). La maggior parte delle proteine che non possiedono il dominio TIR presenta un *coiled-coil domain* (CC) ad N-terminale. Le proteine NBS-LRR sono presenti sia nel recettore NOD-like animale, dove sembra però siano coinvolte nel riconoscimento dei PAMPS (Inohara *et al.*, 2005), che nei fattori apoptotici (APAF1), e nella proteina 4 coinvolta nella morte cellulare (CED4) (Girardin *et al.*, 2003). Il dominio LRR è costituito tipicamente da 20-30 amminoacidi ed è stato ritrovato in tutti gli organismi viventi. I domini LRR sono ipervariabili e questa caratteristica è alla base della specificità di riconoscimento (Dodds *et al.*, 2001). Essi inoltre sembrano essere possibili regolatori negativi delle risposte di difesa.

Il dominio NBS, invece, contiene blocchi di sequenze che sono altamente conservate sia in pianta che negli animali. Le proteine contenenti NBS come i fattori apoptotici APAF1 e CED4, in seguito all'attivazione localizzata nel dominio NBS, oligomerizzano e rendendo accessibili i domini all'N-terminale per proteine adattatrici che attivano la risposta infiammatoria o l'apoptosi (DeYoung e Innes, 2007). Il dominio TIR, presente in alcuni recettori, è coinvolto nella trasduzione del segnale infatti una singola delezione o mutazione della sequenza che codifica il dominio TIR nel recettore N di tabacco blocca la risposta ipersensibile HR (Mestre e Baulcombe, 2006).

I recettori NB-LRR possono riconoscere gli effettori del patogeno con un'associazione fisica diretta o indiretta mediata da proteine accessorie. Il riconoscimento diretto è stato dimostrato per *Pi-ta*, un gene *R* del riso che conferisce resistenza ad alcuni ceppi del fungo *Magnaporthe grisea*, che esprime il fattore di virulenza AVR-Pita. Test del doppio ibrido e saggi *in vitro* hanno mostrato la diretta

NDR1, invece, è richiesta per il “signalling” dei recettori CC-NB-LRRs, che sono tutte proteine associate alla membrana. Tuttavia, anche per NDR1 non si conosce la natura del segnale che ne determina l'attivazione (Day *et al.*, 2006). NDR1 presenta omologia con le integrine di mammifero e presenta un dominio NGD (Asparagina-Glicina-Aspartato) necessario per l'adesione tra membrana plasmatica e parete cellulare. È stato ipotizzato, quindi, che NDR1 svolge un ruolo nella trasduzione del segnale dalla matrice extracellulare (Knepper *et al.*, 2011). In alcuni modelli alcune proteine NB-LRR non sono associate alle membrane ma sono presenti nel citoplasma e solo dopo l'attivazione tramite l'interazione con l'effettore traslocano nel nucleo, dove interagiscono direttamente con fattori trascrizionali come la proteina N di tabacco o RPS4 (*Resistant to P. syringae 4*) di *Arabidopsis* (Wirthmueller *et al.*, 2007).

3.3 Risposte di difesa ai fitopatogeni

Il riconoscimento del patogeno e la conseguente attivazione delle risposte di difesa in pianta sono mediati da messaggeri secondari, comuni nelle cellule eucariote, rappresentati da variazioni della concentrazione di ioni calcio, produzione di ROS e ossido nitrico (NO) e attivazione delle *Mithogen-activated protein kinase* (MAPKs) (Thatcher *et al.*, 2005).

L'accumulo di ioni Ca^{2+} all'interno della cellula ospite è stato riportato in seguito a stress di natura abiotica e biotica (Lecourieux *et al.*, 2006). Sono stati identificati numerosi fattori trascrizionali in *Arabidopsis thaliana* regolati dagli ioni Ca^{2+} come il repressore SR1 (*Signal Responsive1*) e l'attivatore trascrizionale CBP60g (*Calmodulin Binding Proteine 60-like g*) che richiedono il legame con il complesso Ca^{2+} /Calmodulina per esplicare la loro funzione nell'espressione dei geni regolati dall'acido salicilico (Zhang *et al.*, 2010).

Una delle prime risposte di difesa in seguito dell'attacco del patogeno è la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nel processo conosciuto come “oxidative burst”. L'incremento della concentrazione del calcio citoplasmatico stimola la produzione dello ione superossido (O_2^-), attraverso la fosforilazione di una NADPH ossidasi di membrana (Kobayashi *et al.*, 2007). Questo enzima è un'ossidasi analoga al complesso della NADPH ossidasi del sistema immunitario dei mammiferi (responsabile del “burst ossidativo” all'interno dei fagociti). Alcune famiglie di NADPH ossidasi vegetali mostrano, infatti, un'omologia significativa alla subunità gp91 alla NADPH ossidasi dei mammiferi (Torres e Dangl, 2005). Un primo “burst” avviene pochi minuti dopo l'infezione. È stato osservato che l'inattivazione in Tabacco e in *Arabidopsis* del gene che codifica per la NADPH ossidasi blocca il “burst ossidativo” dopo l'elicitazione con criptogeina ottenuta da *Phytophthora cryptogea* e attacco di *Peronospora parasitica* (Nurberger *et al.*, 2004). Una volta rilasciato nell'apoplasto, l'anione superossido subisce la dismutazione a perossido d'idrogeno (H_2O_2) ad opera delle superossido dismutasi (SODs). A sua volta il perossido d'idrogeno può essere ridotto ad acqua e ossigeno molecolare ad opera delle difese antiossidanti della pianta come l'ascorbato perossidasi (Møller *et al.*, 2007). Le ROS in primo luogo esplicano la loro funzione tossica nei confronti dell'invasore all'interno dello spazio intercellulare. In secondo luogo, H_2O_2 media la formazione dei legami incrociati tra le glicoproteine di parete, ricche di idrossiprolina, rafforzando la parete cellulare (Hématy *et al.*, 2009). Molti studi hanno mostrato il ruolo dei ROS anche come componente del “signalling” delle risposte di difesa tramite il controllo redox di alcuni fattori di trascrizione sia tramite l'interazione con componenti della cascata fosforilativa e successiva attivazione a valle di geni codificanti, ad esempio, per le

proteine correlate alla patogenesi (*Pathogenesis-related proteins* o PRs) e per la glutatione-S-transferasi (Kovtun *et al.*, 2000). Le ROS generano derivati dei lipidi come ossilipidi ciclici che possono causare danni alla membrana o funzionare come molecole segnale (Vandenbroucke *et al.*, 2008). L'ossido nitrico (NO), coinvolto in diversi processi fisiologici, è uno dei regolatori delle risposte di difesa vegetali ed è in grado di potenziare la HR determinata dai ROS e di agire, indipendentemente da queste, per indurre la trascrizione di alcuni geni di difesa (Delledonne, 2005). L'HR, identificata per la prima volta da Stackman nel 1915, è caratterizzata dalla rapida morte delle cellule dell'ospite nei pressi del sito d'infezione, con conseguente confinamento della diffusione dei patogeni. È stato evidenziato che in seguito al riconoscimento pianta-patogeno, infatti, nella pianta si verifica, parallelamente al "burst" ossidativo, un picco di NO. Tale picco fa seguito all'incremento dell'attività dell'enzima nitrico ossido sintasi (NOS), che catalizza la trasformazione dell'L-arginina in L-citrullina con liberazione, appunto, di NO. Al pari nei ROS, NO può agire nella difesa sia direttamente, esplicando un'azione tossica nei confronti dei microbi, sia indirettamente attivando altre risposte di difesa (Bolton, 2009).

Componenti chiave della trasduzione del segnale di animali e piante sono MAPKs, che sono coinvolte *in planta* nella regolazione dello sviluppo, crescita, morte cellulare programmata e risposta a diversi stimoli come stress biotici e abiotici. Tramite il meccanismo della fosforilazione questa cascata che comprende MAPKKK (MAPK Kinase Kinase), MAPKK (MAPK kinase), MAPK lega i recettori a proteine "target" come fattori trascrizionali. Il genoma di *Arabidopsis* comprende circa 110 geni che codificano per le putative MAPKs (Colcombet *et al.*, 2008). Le MAPK sono coinvolte sia nella PTI che nell'ETI, in particolare in *Arabidopsis* è stato dimostrato che MKK4 e MKK5 attivano le MPK3 e MPK6 in risposta alla flagellina e tali MAPK sono anche coinvolte nella regolazione dell'espressione delle fitoalessine (Pitzschke *et al.*, 2009).

3.4 Sintesi di composti di difesa

Tra i primi geni di difesa ad essere attivati è anche il gene che codifica per la fenilalanina ammonio liasi (PAL), enzima chiave della biosintesi dei fenipropenoidi comprendenti un vasto gruppo di composti che in seguito a reazioni di dimerizzazione e di polimerizzazione vanno a costituire la lignina, la suberina e la cutina (Zhao e Dixon, 2011).

Nelle piante in seguito all'attacco dei patogeni, si può assistere ad un incremento del contenuto di fenoli solubili che dipende sia da un aumento dell'idrolisi dei polifenoli di riserva, solitamente immagazzinati nei vacuoli come esteri, sia alla sintesi *de novo* di composti fenolici. Inoltre, il contenuto finale dei fenoli non solo è maggiore negli ospiti resistenti che negli ospiti suscettibili ma varia anche dal punto di vista qualitativo. Ad esempio, in piante di tabacco infette da TMV, aumenta il contenuto in acido caffeico, clorogenico e vanillico (Fritig e Hirth, 1971). Nelle piante infette si assiste inoltre all'ossidazione dei fenoli in chinoni e alla loro polimerizzazione in tannini, con conseguente imbrunimento dei tessuti per l'incremento dell'attività delle perossidasi (Pourcel *et al.*, 2007). Le barriere biochimiche ai patogeni comprendono la produzione di composti antimicrobici come fitoalessine. Questi sono composti a basso peso molecolare, del tutto assenti nelle piante sane, appartenenti a gruppi chimici strutturalmente differenti, come i flavonoidi, le furano cumarine, i terpenoidi, gli stilbeni e i poliacetileni. La loro azione è aspecifica verso un ampio spettro di patogeni e si esplica solo nelle prime fasi dell'infezione. La produzione di fitolassine è un meccanismo comune di resistenza a patogeni in molte specie vegetali. Gli isoflavonoidi sono delle fitoalessine comuni nelle famiglie delle leguminose

(faseolina, pisatina) mentre nelle *Solanaceae* (tabacco e pomodoro) vengono prodotti vari sesquiterpeni. In *Arabidopsis* è stata ampiamente caratterizzato il ruolo della camalexina, coinvolta nella difesa da *Phytophthora brassicae* e diversi mutanti *pad* (*Phytoalexin deficient*) presentano alterazione nei pathway biosintetici di tale fitoalessina (Ren *et al.*, 2008).

Risposte chimiche riguardano anche l'attivazione di geni codificanti proteine capaci di degradare le strutture cellulari dei microrganismi patogeni, come ad esempio le chitinasi e le glucanasi che lisano la parte delle cellule batteriche e fungine. Alcune glucanasi e chitinasi sono annoverate tra le proteine correlate alla patogenesi (PR), definite da Van Loon come “proteine la cui espressione è indotta o aumenta, nella pianta, in seguito all'attacco dei patogeni ed in situazioni correlate”. Le PRs sono state scoperte per la prima volta in Tabacco in seguito ad infezione con il TMV (Tobacco Mosaic Virus) (Van Loon e Van Strien, 1999). Le proteine PR sono state classificate in base alla sequenza amminoacidica e delle loro proprietà e suddivise in 17 famiglie numerate in base alla data di scoperta (Fig. 3). Alle PR proteins appartengono anche le defensine (classe delle PR-12) che hanno attività antimicrobica, le PR-10 che intervengono nei processi di fortificazione della parete cellulare e la famiglia delle PR-5 che comprende proteine note come Taumatococina-simili (van Loon *et al.*, 2006).

Family	Type member	Properties	Gene symbols
PR-1	Tobacco PR-1a	Unknown	<i>Ypr1</i>
PR-2	Tobacco PR-2	β -1,3-glucanase	<i>Ypr2</i> , [<i>Gns2</i> (' <i>Glb</i> ')]
PR-3	Tobacco P, Q	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII	<i>Ypr3</i> , <i>Chia</i>
PR-4	Tobacco 'R'	Chitinase type I, II	<i>Ypr4</i> , <i>Chid</i>
PR-5	Tobacco S	Thaumatococin-like	<i>Ypr5</i>
PR-6	Tomato Inhibitor I	Proteinase-inhibitor	<i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> (' <i>Pin</i> ')
PR-7	Tomato P ₆₉	Endoproteinase	<i>Ypr7</i>
PR-8	Cucumber chitinase	Chitinase type III	<i>Ypr8</i> , <i>Chib</i>
PR-9	Tobacco "lignin-forming peroxidase"	Peroxidase	<i>Ypr9</i> , <i>Prx</i>
PR-10	Parsley "PR1"	Ribonuclease-like	<i>Ypr10</i>
PR-11	Tobacco "class V" chitinase	Chitinase, type I	<i>Ypr11</i> , <i>Chic</i>
PR-12	Radish Rs-AFP3	Defensin	<i>Ypr12</i>
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Thionin	<i>Ypr13</i> , <i>Thi</i>
PR-14	Barley LTP4	Lipid-transfer protein	<i>Ypr14</i> , <i>Ltp</i>
PR-15	Barley OxOa (germin)	Oxalate oxidase	<i>Ypr15</i>
PR-16	Barley OxOLP	Oxalate-oxidase-like	<i>Ypr16</i>
PR-17	Tobacco PRp27	Unknown	<i>Ypr17</i>

Fig. 3.: Le principali famiglie delle proteine PR da “Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants” di van Loon *et al.*, 2006

3.5 Resistenza sistemica indotta

Oltre che dai ROS e NOS, le prime risposte di difesa sono spesso amplificate attraverso la generazione di molecole secondarie (metilsalicilato, jasmonati, acido azelaico, terpenodi, composti volatili) che possono attivare le difese sia localmente, nel sito di infezione, che sistemicamente, in tessuti della pianta lontani da quelli infetti (Shah, 2011). L'accumulo di SA ed il suo ruolo della Resistenza Sistemica Acquisita (SAR) è stato messo in evidenza in seguito alla constatazione che piante di tabacco pre-inoculate con TMV risultavano resistenti nei confronti di successive inoculazioni con lo stesso virus o con microrganismi diversi (Van Loon, 2007). Successivamente è stato dimostrato come il trattamento delle piante con lo stesso acido salicilico o con suoi analoghi funzionali INA (acido 2,6 dicloro-isonicotinico) o BTH (benzotiadiazolo) induce l'attivazione di risposte di difesa sistemica. Difese sistemiche possono essere indotte nella pianta anche dai rizobatteri non patogeni che colonizzano le radici. In questo caso si parla di Resistenza Sistemica Indotta (ISR) (van Loon, 2007).

L'SA è un composto di natura fenolica e come tale è sintetizzato in pianta a partire dall'acido corismico, che deriva dall'acido scichimico. L'acido corismico è trasformato in fenilalanina che, per mezzo della fenilalanina ammonio liasi (PAL) è convertita, nelle dicotiledoni, in acido cinnamico oppure per mezzo della tirosina ammonio liasi (TAL) è trasformata, nelle monocotiledoni, in acido p-cumarico. Dall'acido p-cumarico derivano i differenti fenoli tra cui SA (Sendon *et al.*, 2011). Per un lungo periodo l'acido salicilico è stato considerato il segnale mobile associato alla SAR, prodotto dalle porzioni di pianta trattate dall'induttore e traslocato nelle parti non trattate scatenando in queste le risposte di difesa.

Esperimenti condotti su piante di tabacco cv Xanthi, che possiedono il gene *N* responsabile della resistenza al TMV, hanno evidenziato che il metil salicilato (MeSA) è il segnale sistemico che conferisce resistenza a infezioni successive di TMV (Park *et al.*, 2007). Questi studi indicano che il MeSA sintetizzato dal SAMT1 (*SA-metil transferase*) nella foglia inoculata, è traslocato sistemicamente nelle altre foglie, dove è idrolizzato dalla SABP2 (*MeSA methyl esterase*) ad acido salicilico, responsabile dell'espressione dei geni di difesa (Park *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2009).

A valle dell'acido salicilico, sono stati identificati diversi geni coinvolti nell'attivazione del "pathway" SAR, tra cui il gene NPR1/NIM1 considerato il regolatore centrale positivo della SAR. NPR1, che codifica per una proteina contenente un dominio ankirina e un dominio BTB/POZ (*broadcomplex, tramtrack, bric-a-brac/poxvirus, zinc finger*), è stato identificato isolando dei mutanti puntiformi "loss-of function" incapaci di esprimere alcune proteine PR e più suscettibili a infezione di *Peronospora parasitica* (Delaney, 2000). In risposta all'acido salicilico che induce un cambiamento dello stato ossidativo cellulare, NPR1, normalmente localizzato in forma oligomerica inattiva nel citoplasma, a seguito della riduzione dei ponti disolfuro che stabilizzano l'oligomero, migra nel nucleo in forma monomerica dove interagisce positivamente con dei fattori trascrizionali bzip della famiglia TGA. Tali fattori promuovono a loro volta la trascrizione di PR1 e determinano allo stesso tempo la soppressione del "signalling" dell'acido jasmonico (Pieters e Van Loon, 2004). L'overespressione di NPR1 in *Arabidopsis* ha determinato infatti una maggiore resistenza a patogeni associata a induzione di proteine PR (Friedrick *et al.*, 2001). L'overespressione in riso ha determinato a sua volta maggiore resistenza a *Xanthomonas oryzae* e lo sviluppo di un fenotipo "lesion-mimic/cell death" correlato all'espressione di geni di difesa e all'accumulo di perossido di idrogeno (Fitzgerald *et al.*, 2004). Anche in tabacco è stata identificata una proteina PR1-a il cui promotore presenta dei motivi TGACG riconosciuti da TGA e coinvolti nella risposta a SA (Strompen *et al.*, 1998). Fattori TGA di tabacco (Niggeweg *et al.*, 2000), ma anche di riso (Chern *et al.*, 2001), hanno mostrato di interagire con NPR1 di *Arabidopsis* *in vitro* ed *in vivo*. In particolare una proteina NPR1-like è stata identificata anche in tabacco ed ha mostrato il 52 % di identità e il 72% di similarità con NPR1 di *Arabidopsis*. Tale proteina ha rivelato di essere essenziale per la resistenza a TMV (Liu *et al.*, 2002).

3.6 Nuovi approcci biotecnologici per incrementare le difese vegetali

Le approfondite conoscenze sulle risposte di difesa delle piante ai fitopatogeni forniscono nuovi strumenti all'ingegneria genetica per l'ottenimento di resistenze a più ampio spettro e più durevoli (Gust *et al.*, 2010). Ad esempio, in riso, la overespressione del gene BAK1 incrementa la resistenza a *M. grisea* (Li *et al.*, 2009). Ciò suggerisce che il potenziamento dei meccanismi di riconoscimento rappresenta un'opportunità per incrementare la difesa vegetale, ma può essere rapidamente superata dai patogeni (Xiang *et al.*, 2008). È stato sperimentato l'utilizzo dei geni *R*,

ma spesso il prodotto proteico conferisce resistenza solo ad una specifica razza del patogeno. In letteratura, l'introgressione del gene *R Rpi-blb1* di *Solanum bulbocastanum* nella patata coltivata conferisce una resistenza a più ampio spettro a diverse razze di *Phytophthora infestans* (Vleeshouwers *et al.*, 2009). È quindi di fondamentale importanza in questo tipo di approccio la ricerca di geni *R* che mostrano la capacità di riconoscere un ampio spettro di effettori.

L'identificazione dei composti antimicrobici sintetizzati in seguito all'attivazione delle risposte di difesa rappresentano una valida strategia utilizzata anche nei primi approcci delle biotecnologie vegetali (Stuiver e Custers, 2001). Ad esempio, in pomodoro e tabacco, la produzione eterologa della fitoalessina resveratrolo di *Vitis vinifera* attraverso l'ingegneria genetica vegetale ha incrementato la resistenza a diversi fitopatogeni (Hain *et al.*, 1993; Thomzik *et al.*, 1997). L'overespressione dei geni che codificano per enzimi idrolitici come le PR proteins che hanno come target la parete cellulare fungina ha dimostrato di incrementare le difese anche in colture importanti per l'alimentazione umana come riso e grano (Gomez-Ariza *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2008). Il gene codificante l'enzima glucosio-ossidasi, clonato da *Aspergillus niger*, è stato espresso in piante di patata per aumentare il livello di perossido di idrogeno nei tuberi transgenici e nelle foglie in seguito all'infezione batterica. Le progenie hanno mostrato incrementata resistenza a *Erwinia amilovora* sia sotto condizioni aerobiche che anaerobiche. Le linee transgeniche sono risultate anche meno suscettibili a *Phytophthora infestans* (Wu *et al.*, 1997).

In contrasto con le strategie mostrate in precedenza, l'espressione costitutiva dei geni coinvolti nella trasduzione del segnale può attivare le risposte di difesa per intero. NPR1, come descritto in precedenza, è il regolatore chiave della risposta sistemica acquisita ed il gene codificante è stato isolato in molte specie. In particolare l'overespressione del gene *NPR1* in *Arabidopsis*, riso, tabacco, melo e grano incrementa le difese senza modificare altri caratteri (Chern *et al.*, 2005; Makandar *et al.*, 2006).

Il sequenziamento dei genomi microbici ha consentito la comprensione di come gli effettori manipolino il metabolismo della pianta ospite. Tale strategia si è dimostrata utile nei confronti di *Sclerotinia sclerotiorum* attraverso l'introgressione in pianta dei geni responsabili della degradazione enzimatica del fattore di virulenza, l'acido ossalico (Stuiver e Custers, 2001). L'overespressione di polPGIP proteins (*polygalacturonase-inhibitor proteins*) incrementa la resistenza a funghi che producono poligattatturonasi come fattori di virulenza (De Lorenzo *et al.*, 2001) e, allo stesso tempo, è stato dimostrato che l'espressione di proteine anti-apoptotiche, *in planta*, conferisce resistenza a quei patogeni che attraverso la secrezione di tossine inducono la morte cellulare programmata (Babaeizad *et al.*, 2009).

3.7 Immunità innata in insetti e mammiferi

L'abilità di discriminare tra "self" e "non-self" è una caratteristica chiave di tutti gli organismi viventi ed è la base dell'attivazione dell'immunità innata dopo l'infezione microbica. Il sistema dell'immunità innata negli animali e negli insetti è stato descritto e analizzato in dettaglio e mostra alcune similarità con il sistema di difesa vegetale (Nurnberger *et al.*, 2004) (Fig. 4). In *Drosophila melanogaster* sono state individuate due distinte vie metaboliche che portano alla produzione di peptidi tossici contro funghi e i batteri Gram-positivi (la via "Toll") e contro batteri Gram-negativi (la via IMD). Toll è un recettore transmembrana (Engstrom, 1999), la cui attivazione è mediata dall'interazione con la proteina Spaetzle. Il dominio intracitoplasmatico di TOLL attiva dunque una cascata di proteine tra cui ben note sono Tube e Pelle.

Quest'ultima è una chinasi la cui attivazione conduce alla fosforilazione di CACTUS, una I κ B (*inhibitor of kappa B*) avente sei ripetizioni di ankirina, e alla sua dissociazione dal suo partner NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*), DIF (*dorsal-related immunity factor*) e alla conseguente degradazione nel proteasoma. DIF è dunque libero di migrare nel nucleo e attivare la trascrizione di proteine coinvolte nella difesa, come la Drosomicina e la Metchnikowina (Hoffmann e Reichhart, 2002; Hoffmann, 2003).

Fra le proteine chiave nella regolazione della risposta immunitaria di insetti e mammiferi vi sono i fattori trascrizionali NF- κ B che sono coinvolti nelle fasi iniziali di attivazione del sistema immunitario (Baeuerle e Henkel, 1994; Grimm e Baeuerle, 1993). Attivati da una grande varietà di stimoli sia biotici, quali virus e batteri, che abiotici, come radiazioni e ossidazione, tali fattori rappresentano un raffinato esempio di controllo post-traduzionale di proteine implicate nella trascrizione e sono coinvolti nell'attivazione di numerosi geni implicati nella difesa, quali citochine, molecole di adesione cellulare e anticorpi. Gli NF- κ B sono normalmente presenti nel citoplasma in forma inattiva poichè associati in modo non covalente con proteine I κ B (*inhibitor*) (Ghosh e Karin, 2002) che ne mascherano il segnale di localizzazione nucleare (NLS), localizzato generalmente sulla porzione C-terminale della RHR (*Rel homology region*) (Beg *et al.*, 1992). Tali proteine sono ricche di domini ankirina, così definiti dal nome della proteina Ankirina degli eritrociti (Bork, 1993). Tali domini sono generalmente costituiti da ripetizioni di 33 aminoacidi di cui 15 altamente conservati che ne costituiscono la sequenza consenso (Palek e Lambert, 1990) formanti 2 eliche antiparallele connesse da un motivo "Bhairpin" che mediano le interazioni proteina-proteina in diverse famiglie (Sedgwick e Smerdon, 1999). A seguito dello stimolo esterno di innesco della via di trasduzione del segnale, si verifica l'attivazione delle I κ B kinase o IKK (Karin e Ben-Neriah, 2000) e la conseguente fosforilazione dei residui di serina all'estremità N-terminale dell'inibitore (Ghosh *et al.*, 1998). Le I κ B fosforilate vengono quindi riconosciute dal complesso definito b-TRCP-cointaining SCF ubiquitin ligase, con la successiva ubiquitinazione e degradazione mediata dal proteosoma (Karin e Ben-Neriah, 2000). La degradazione dell'I κ B scopre quindi il segnale di localizzazione nucleare dell'NF- κ B determinandone la traslocazione nel nucleo e dunque il legame a enhancers o promotori target. Una volta nel nucleo, l'NF- κ B attiva nuovamente la sintesi dell'I κ B (Chiao *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 1993). Le I κ B sintetizzate *de novo* entrano nel nucleo, attraverso una non convenzionale NLS, staccano l'NF- κ B dal DNA e lo riportano nel citoplasma provvedendo in questo modo allo spegnimento dei geni target dell'NF- κ B (Turpin *et al.*, 1999).

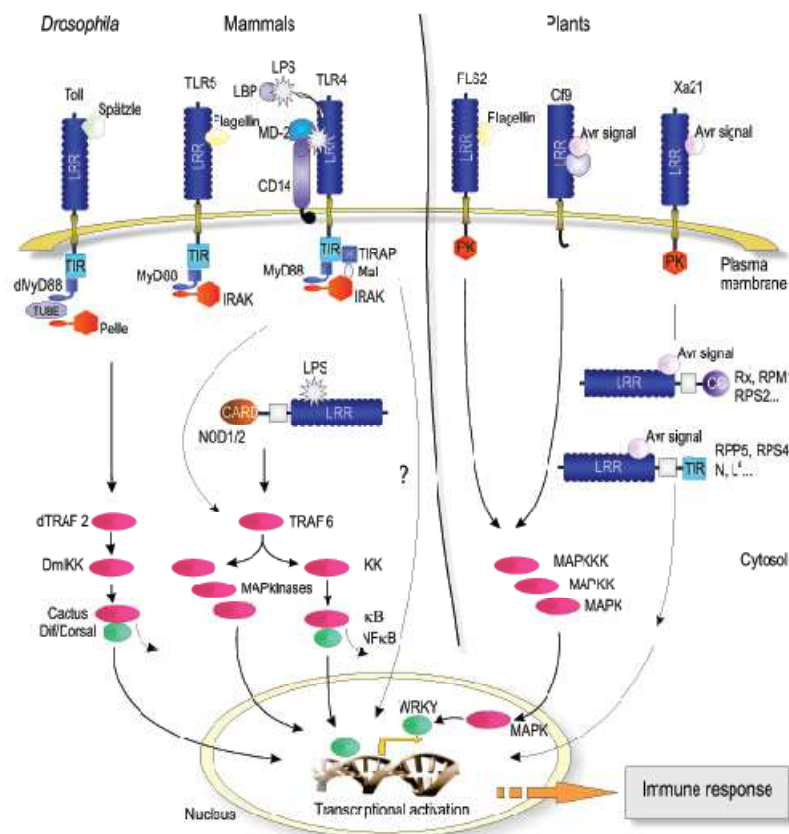


Fig 4.: Immunità innata in pianta, animale e insetto (modificata da Nürnberger *et al.*, 2004)

3.8 *Heliothis virescens-Toxoneuron nigriceps*: i geni *TnBVank*

Toxoneuron nigriceps (Hymenoptera, Braconidae) è un parassitoide endofago di *Heliothis virescens*. Larve di quinta età diventano, a seguito dell'attacco, incapaci di impuparsi e mostrano gravi alterazioni della composizione emolinfatica che risulta in un alto valore nutritivo per favorire lo sviluppo del parassitoide (Pennacchio *et al.*, 1993). Quest'ultimo è simbioticamente associato a un Bracovirus, il *Toxoneuron nigriceps* Bracovirus, che viene iniettato al momento dell'ovideposizione insieme alle uova nel corpo dell'ospite. Caratterizzato da un genoma composto da segmenti circolari di dsDNA di taglia compresa fra 2,5 e 32 kb (Varricchio *et al.*, 1999), esso è incapace, come noto per i Polydnavirus, di replicarsi nell'ospite, ma dà inizio alla trascrizione già poche ore dopo la parassitizzazione e fino al completamento del ciclo del parassitoide. Il TnBV è fortemente coinvolto nell'alterazione del sistema immunitario nell'ospite e il sequenziamento del suo genoma e l'analisi d'espressione dei ha consentito di identificare i geni chiave della soppressione della risposta immunitaria (Falabella *et al.*, 2007).

Sono stati sequenziati nel genoma del TnBV tre geni Ikb-like identificati come *TnBVank1-3* e localizzati rispettivamente sul cerchio 4,7 kb per il *TnBVank1* e sul cerchio 10,3 kb per *TnBVank2* e *TnBVank3* (Fig. 5).

Il *TnBVank1* isolato nel TnBV è caratterizzato, come gli altri due prodotti Ikb-like del PDV denominati *ank2* e *ank3* dalla presenza di domini ankirina formati da 4 ripetizioni che ne permettono il legame a fattori NFκB, ma manca del caratteristico dominio N-terminale SRD (*Signal Receiving Domain*) per la fosforilazione della serina, necessaria alla successiva ubiquitinazione, e del dominio PEST coinvolto nel rapido turnover (Ghosh *et al.*, 1998; Ghosh e Karin, 2002). Queste caratteristiche molecolari suggeriscono un'ipotesi di legame irreversibile dei prodotti *TnBVank*

all'NF- κ B dell'ospite per alterarne la via di trasduzione del segnale difesa (Falabella *et al.*, 2007). Tale ipotesi è stata confermata recentemente dall'analisi funzionale delle proteine N5 e H4 identificate nel *Microplitis demolitor* bracovirus (MdBV) che hanno mostrato di sopprimere la risposta immunitaria (Thoetkiattikul *et al.*, 2005). Tali proteine ricombinanti hanno infatti ridotto l'espressione di geni reporter regolati da NF- κ B in cellule S2 di *Drosophila* e hanno mostrato di legare proteine DIF e Relish sequestrandole nel citoplasma e inibendo il loro legame ai siti κ B di geni codificanti peptidi antimicrobici.

Esperimenti di immunocitochimica hanno mostrato che nelle larve parassitizzate, dopo infezione batterica, il segnale di localizzazione di proteine NF- κ B è ritenuto nel citoplasma, sia negli emociti che nel "fat body" dell'ospite (Falabella *et al.*, 2007).

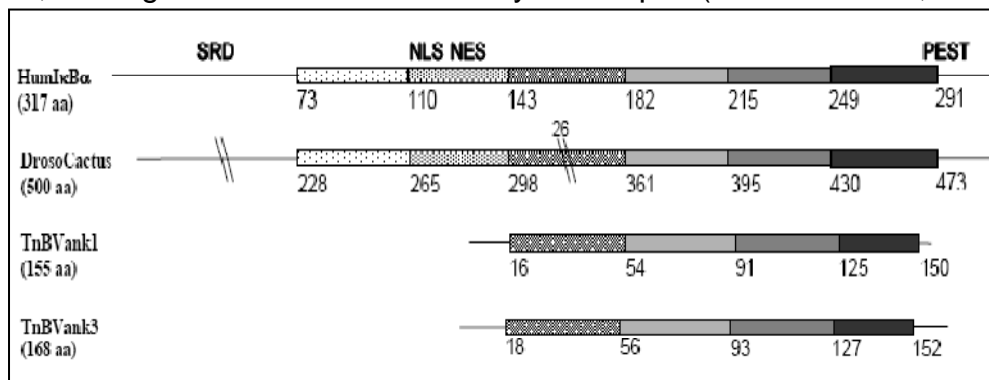


Fig. 5: Proteine TnBVANK a confronto con I κ B di *Drosophila melanogaster* e umana

3.9 Le I κ B caratterizzate in pianta

Anche in pianta è stato dimostrato che sono presenti meccanismi simili all'interazione NF- κ B/I κ B: alcuni coattivatori delle risposte di difesa sono sequestrati nel nucleo o nel citoplasma per impedire l'attivazione dei geni di difesa (Moore *et al.*, 2011). Il fattore trascrizionale bZIP10 è un attivatore delle risposte di difesa coinvolte nella HR. In condizioni normali la proteina LSD1 (*Zinc-Finger protein Lesion Stimulating Disease resistance 1*) interagisce con bZIP10 e in parte la sequestra nel citoplasma. Il "burst" ossidativo promuove la dissociazione di bZIP10 da LSD1, consentendo la traslocazione nel nucleo e la conseguente attivazione delle risposte di difesa (Kaminaka *et al.*, 2006). L'I κ B, la cui funzione è stata meglio caratterizzata in pianta è NPR1, descritta nel paragrafo 3.6.

Altra proteina che mostra omologia con gli inibitori I κ B è la proteina AKR2. La sottoespressione del gene *AKR2* realizzata con tecniche antisense ha infatti determinato un incremento di produzione di H₂O₂, la over-espressione della *PR1* e del gene che codifica per la glutatione S-trasferasi 6, la comparsa di necrosi sulle foglie, associata a una maggiore resistenza a *Pseudomonas syringae* (Yan *et al.*, 2002). AKR2 è coinvolta nella regolazione del livello di perossido di idrogeno ottimizzando l'attività di degradazione di tale molecola da parte di una ascorbato perossidasi (APX3). AKR2 funge da chaperone molecolare che lega APX3 subito dopo la sintesi da parte di ribosomi liberi e, in seguito a elicitazione, rilascia APX3 alle membrane dei perossisomi (Shen *et al.*, 2010). Il ruolo di AKR2 sembra essere pleiotropico in quanto mutanti *akr2* mostrano difetti nello sviluppo e a livello fisiologico (Zhang *et al.*, 2010).

In tabacco è stato identificato un omologo di *AKR2*, chiamato *ANK1*, con un'identità del 66%. La proteina ANK1 è un regolatore chiave nel "pathway" dell'auxina. In seguito a trattamento con auxina ANK1 migra nel nucleo, dove interagisce con il fattore trascrizionale BZI-1. È stato ipotizzato che il complesso BZI-1 e ANK1 stimola

la trascrizione dei geni target (Bottnner *et al.*, 2009). Tale modello ricorda i pathway regolati da NPR1. Nella risposta a patogeni il gene *ANK1* è sottoespresso e sembra essere un regolatore negativo del fattore trascrizionale fattore BZI-1, coinvolto nell'attivazione di geni responsabili della morte cellulare nella risposta ipersensibile (Kuhlmann *et al.*, 2003).

Proteine recentemente scoperte e che mostrano alta omologia con AKR2 e con ANK1 sono le tre proteine TIP (TGB12K-interacting proteins) altamente conservate fra loro, ove la proteina TGB12K è stata identificata in PVX. Tale proteina sembra essere coinvolta nell'aumento del “*size exclusion limit*” (SEL) dei plasmodesmi per promuovere il movimento intercellulare del virus (Tamai e Meshi, 2001).

3.10 Scopo della tesi

I meccanismi di difesa delle piante presentano similarità con il sistema immunitario animale, sebbene siano il risultato di un'evoluzione distinta. In particolare, i recettori transmembrana sia vegetali che animali presentano il dominio LRR, caratterizzato da un pattern conservato di leucine idrofobiche, che, in entrambi i regni, è deputato ad interagire con i PAMPS. Tale dominio è stato ad esempio ritrovato nel recettore Toll di *Drosophila*, nei recettori TLR4 e TLR5 dei mammiferi e nelle proteine R vegetali.

Lo scopo del presente lavoro di dottorato è stato quello di studiare, in tabacco, gli effetti dell'espressione eterologa del gene virale *TnBVank1* ed il suo coinvolgimento nella difesa della pianta da larve di lepidotteri e dal fungo necrotrofo *Botrytis cinerea*. La prima fase del lavoro ha riguardato la caratterizzazione delle linee transgeniche di tabacco per il gene *TnBVank1*. Lo studio è proseguito con lo *screening* delle differenti linee transgeniche e la loro valutazione in saggi biologici. Infine, è stato effettuato uno studio trascrittomico mediante microarray per indagare l'impatto dell'espressione costitutiva del transgene sul trascrittoma del tabacco.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Descrizione dei materiali

I materiali vegetali utilizzati sono linee transgeniche di *Nicotiana tabacum* cv Samsun genotipo NN trasformate con il gene *TnBVank1*. Il gene virale è stato posto sotto il controllo del promotore costitutivo 35S del virus del Mosaico del Cavolfiore (CaMV) (Guilley *et al.*, 1982), e fuso al 5' alla sequenza che codifica per il peptide segnale della proteina Pr1b di tabacco (Dixon *et al.*, 1991) e al 3' le sequenze che codificano per il peptide segnale KDEL e per l'epitopo myc.

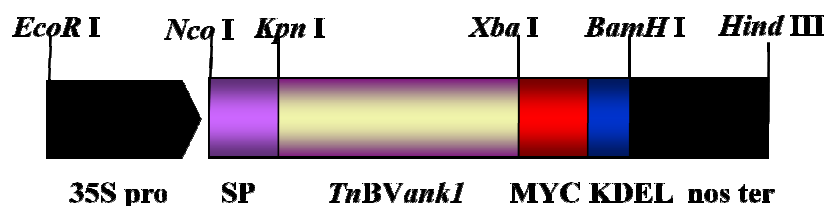


Fig. 6: Costrutto utilizzato per l'espressione in pianta del gene *TnBVank1*: 35S P: promotore del RNA 35S di virus dei mosaico del cavolfiore; SP: signal peptide; *TnBVank1*: sequenza codificante per la proteina virale; myc: epitopo c-myc; KDEL: segnale di ritenzione nel ER; nos ter della nopalina sintasi

4.1.1 Analisi della sequenza di *TnBVank1*

Le putative caratteristiche biochimiche e la presenza di domini funzionali della proteina sono state predette attraverso i software SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) ed ExPASy proteomic server (<http://us.expasy.org/>), in particolare ScanProsite (<http://us.expasy.org/tools/scanprosite/>). L'allineamento con altre proteine presenti in database è stato realizzato con il software CLUSTAL W disponibile online (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) e in rielaborato tramite BOXSHADE (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/boxshade.html>). E' stata inoltre effettuata una ricerca di PEST domains con il software PESTfind (<https://emb1.bcc.univie.ac.at/toolbox/pestfind/pestfind-analysis.webtool.htm>) e una ricerca di domini SUMO con il software SUMOplot (<http://bioinformatics.lcdustc.org/sumo/links.php>).

4.1.2 Allevamento del materiale vegetale

La semina del tabacco della generazione T1 è stata realizzata previa sterilizzazione di circa 100 semi per volta in 1 ml di etanolo al 70% con 2 min di agitazione manuale. L'etanolo è stato sostituito con 1 ml di candeggina all'1,5% lasciando i campioni in agitazione per 12 min e sottoposti a 4 lavaggi di 1 ml ciascuno con acqua sterile. Eliminata l'acqua, i semi sono stati distribuiti in piastre Petri su MS30 (4.3 g MS sali minerali, 30 g saccarosio, 8 g microagar per 1 L, pH 5.8) o su MS30 supplementato di kanamicina 100 mg/l per la selezione di semi transgenici. Le piastre sono state lasciate al buio per circa 10 giorni e quindi esposte alla luce. Le piante, sia *in vitro* che *in vivo*, sono state allevate in condizioni di temperatura costante di 24°C, con illuminazione di 10000 lux e fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio.

4.2 Caratterizzazione molecolare

4.2.1 Estrazione dell' RNA

Circa 0.5 g di tessuto vegetale prelevato dalle piante transgeniche sono state macinate in azoto liquido. Il tessuto macinato è stato quindi trasferito in tubi da 2 ml contenenti 750 µl di buffer di estrazione e 750 µl di fenolo/cloroformio 1:1 (v/v), agitando immediatamente con il vortex fino alla formazione di un'emulsione. Dopo centrifugazione a 14000 rpm a 4°C per 5 min, è stata prelevata la fase acquosa e ripetuta l'estrazione fenolo/cloroformio. In seguito ad successiva centrifugazione, e ripetizione dell'estrazione con solo cloroformio, si è prelevata la fase acquosa e si sono aggiunti 750 µl di isopropanolo, con successivo trasferimento in ghiaccio per 5 min e centrifugazione a 14000 rpm a 4°C per 10 min. A questo punto è stato eliminato il sovrantante, risospeso il pellet in 400 µl di acqua bidistillata sterile, aggiunto un volume di 400 µl 4 M di cloruro di litio ed incubato il tutto per un tempo minimo di 4 h in ghiaccio. E' stata eseguita, quindi, una centrifugazione per 20 min a temperatura ambiente a 14000 rpm, si è prelevato il sovrantante e risospeso il pellet in 400 µl di acqua bidistillata sterile. Sono stati dunque aggiunti 40 µl di 3 M acetato di sodio (pH 7.0) e 1 ml di etanolo 96%, incubando per 10 min a -80°C e centrifugando per 10 min a 14000 rpm a 4°C. Infine il pellet è stato risospeso in 42 µl di acqua bidistillata sterile. La concentrazione del RNA estratto è stata determinata mediante analisi allo spettrofotometro. RNA è stato diluito 1:100 con acqua bidistillata ed è stata misurata l'assorbanza a 260 nm con lo spettrofotometro. La concentrazione in µg/µl dell'RNA è stata calcolata sapendo che: $1OD_{260} = 40\mu\text{g/ml}$. E' stato dunque misurato il rapporto A_{260}/A_{280} nm. In seguito, aliquote di 5 µg di RNA, addizionate con 15 µl di buffer denaturante e trattate a 65°C per 15 min, sono state corse in elettroforesi su gel di agarosio al 1,2% in TAE 1X (40mM Tris acetate, 1 mM EDTA) .

4.2.2 RT-PCR

10 µg del RNA totale estratto è stato trattato a 37°C per venti minuti con RNase-free DNase I (BioLabs) (1U DNase/3 µg RNA) per eliminare ogni contaminazione da DNA in 1X NEBuffer (BioLabs). RNA è stato precipitato aggiungendo 1/10 del volume di NaAc 3M (pH 7.0), 2 volumi di etanolo al 100%, raffreddato a -80°C per 10 min e centrifugato a 4°C a 14000 rpm per 15 min. Il pellet è stato lavato con 1 volume di etanolo a 70% raffreddato di nuovo per 10 minuti a -80°C, centrifugato a 14000 rpm per 10 min e poi risospeso in 20 µl di acqua. Per la sintesi del mRNA è stato utilizzato il kit RevertAid First Strand cDNA synthesis (Fermentas), seguendo le istruzioni d'uso della casa produttrice. Il cDNA è stato sintetizzato da 2 µg dell'RNA privo di DNA e il cDNA è stato conservato a -20°C fino all'analisi. La sintesi del cDNA è stato controllato utilizzando i primers sul Elongation Factor-1 alpha (EF-1α) di *Nicotiana tabacum*, disegnati per annilare su due esoni del gene (Kumagai *et al.*, 1995). I primers riportati in Tabella1 sono stati utilizzati per il controllo della sintesi del cDNA e per verificare la trascrizione del transgene. La reazione PCR è stata allestita in 25 µl contenenti 1 µl di cDNA, 0.4 mM primers, 1.5 mM MgCl₂, 100 mM dNTPs e 0.5 U Taq DNA Polymerase (Promega) in 1X PCR buffer (Promega). L'amplificazione è stata condotta come mostrato in Tabella 1. I prodotti dell'amplificazione sono stati controllati in gel d'agarosio al 1.2% colorato con etidio bromuro.

Tab.1: *Primers* utilizzati per l'amplificazione di *EF-1α* e *TnBVank1*

PRIMERS	SEQUENZA (5' – 3')	GENE (SPECIE)	THERMAL CYCLING	Amplificato (bp)
NT-EF fw	AGACCACCAAGTACTACTGC	<i>EF 1-α</i> <i>N. tabacum</i>	94°C 45 ""	422
NT-EF rv	CTCTTCTTGAGGCTCTTGAC		55°C 45 ""	
			72°C 45 ""	
TnBVAnk1for	GAAAACTCATTACTCATTGAATTG	<i>TnBVank1</i> <i>Toxoneuron nigriceps</i>	94°C 45 ""	450
TnBVAnk1rev	GCCATATCGTAAGGGGTCTTC		55°C 45 ""	
			72°C 45 ""	

ACC. NUM. = numero d'accesione; L.A. = Lunghezza dell'amplicone

4.2.3 Estrazione delle proteine totali da tessuti vegetali

Circa 0.6 g di foglie di tabacco sono stati polverizzati in azoto liquido e ad essi sono stati aggiunti 0.2 ml di tampone di estrazione (5mM EDTA, 200mM Tris pH 8.8, 1M Saccarosio, 10% SDS, 1M DTT). La miscela è stata agitata per 10 min a temperatura ambiente e centrifugata a 14000 rpm per 20 min a 4°C. Il supernatante è stato trasferito in eppendorf e conservato a -20°C. Sono state estratte anche le proteine di una pianta non trasformata (NN) come controlli negativi. Le proteine totali solubili sono state quantificate tramite spettrometro (Eppendorf Biophotometer) con il metodo Bradford, utilizzando la Bovine Serum Albumin (BSA) come proteina standard (Bradford, 1976).

4.2.4 SDS-PAGE e analisi western blotting

Un volume di proteine totali corrispondenti a 60 µg per ciascun campione è stato addizionato a un eguale volume di "loading dye" (0.1% Blu di Bromofenolo, 5mM EDTA, 200mM Tris pH 8.8, 1M saccarosio, 10% SDS e 1M DTT) e i campioni sono stati riscaldati a 100°C per 5 min per la successiva separazione SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE), costituito da Resolving gel (8 ml del 30% acrylamide, 5 ml di 1.5 M Tris pH 8.8, 0.2 of 10% SDS, 0.2 of 10% ammonio persolfato, 8 µl di TEMED fino 20 ml con H₂O) e Stacking gel (670 µl del 30%, acrylamide, 500 µl di 1.0 M Tris pH 6.8, 40 µl di 10% SDS, 40 µl di 10% ammonio persolfato, 4 µl di TEMED fino a 4 ml con H₂O). Per la corsa elettroforetica è stato preparato il buffer di corsa 5X Tris-Glycine-SDS (94 g Glicina, 15.1 g Tris, 50ml 10% SDS per 1 litro, pH 8.8) che è stato diluito 1:5 per ottenere 1X "running buffer". La corsa elettroforetica è stata eseguita in Mini Protean Tetra Cell (Bio Rad) a 100 volts per circa un'ora. Il Precision Plus (Bio Rad) è stato utilizzato come standard proteico di peso molecolare.

4.2.5. Electroblothing e Western Blot

Dopo l'elettroforesi, il gel è stato posto nella cassetta per l'elettroblothing per trasferire le proteine su membrana di nitrocellulosa Trans-Blot Transfer Medium (Bio-Rad) nel electroblotting buffer (50 mM Trizma, 380 mM Glycine, 10% metanolo) a 100 volts per circa un ora. Dopo il "blotting", le proteine sul filtro sono state fissate nella soluzione di "blocking" per almeno un ora (5% Latte in polvere, 0.5% Tween20 in 1x PBS buffer). Un litro di PBS 10X (phosphate buffered saline) è stato preparato con 87 g NaCl, 22.5 g Na₂HPO₄, 2 g KH₂PO₄, portato a pH 7.4 (Sambrook e Russell, 2001). Ogni passaggio d'incubazione e di lavaggio sono stati effettuati su agitatore con piastra ad oscillazione rotatoria a temperatura ambiente. La membrana è stata poi incubata per 3 ore a temperatura ambiente con l'anticorpo primario anti-myc (Santa Cruz), diluito nel rapporto 1:500 in 15 ml di soluzione di "blocking". Dopo 4 lavaggi con PBS 1X e 0.5% di Tween 20, al filtro è stato, quindi, aggiunto per 1 ora l'anticorpo secondario (anti-rabbit, Amersham) ad una diluizione di 1:2000 in

“blocking solution”. Il filtro è stato lavato come descritto sopra, ma con un ultimo lavaggio in solo PBS1X per evitare che la presenza del detergente potesse disturbare le fasi successive di sviluppo. La membrana è stata quindi posta a contatto con le due soluzioni fornite dal kit ECL (Amersham), avvolta in pellicola trasparente e messa a contatto con una lastra kodak per un tempo di 5 min. Una seconda lastra è stata lasciata poi a contatto con la membrana per 40 min.

4.3 Immunolocalizzazione della proteina in protoplasti di tabacco

4.3.1 Isolamento dei protoplasti

Foglie di piantine transgeniche e *wild type* micropropagate e cresciute in condizioni sterili fino ad una altezza di 5-6 cm sono state utilizzate per ottenere protoplasti. Sono state utilizzate foglioline ben espanse, dal 2° al 4° internodo, purché prive di segni di stress e non a contatto con le pareti del contenitore di crescita. Le foglioline sono state poste in una piastra Petri disposte in uno strato continuo, limitando per quanto possibile le sovrapposizioni dei tessuti. Sono state poi incise con un bisturi, in modo da provocare tagli su tutta la superficie, utili alla penetrazione degli enzimi. Sul materiale così preparato sono stati aggiunti 10 ml di soluzione di digestione (2% Cellulase, 0.25% Macerozyme R-10 e Driselase 0,5%) preparata in K3 medium (B5 medium including Vitamins, 136.92 g/l saccarosio, 250 mg/l xylosio, 250 mg/l NH_4NO_3 , 750 mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 63.3 mg/l $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25.35 mg/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mg/l NAA, 0.2 mg/l 6-BAP, 0.1 mg/l 2,4-D, pH 5.6). Le piastre sono state chiuse con il parafilm e messe a incubare “overnight” a 26°C, al buio. Dalle piastre è stata prelevata la sospensione di protoplasti con una pipetta Pasteur con la punta tagliata, per evitare di danneggiare le cellule. La sospensione è stata filtrata su un filtro metallico con passo di 150 μm sterile, e divisa in aliquote di 5 ml in ogni tubo. Ad ogni aliquota è stato aggiunto delicatamente sulla superficie 1 ml di W5 (9 g/l NaCl, 18.4 g/l CaCl_2 , 0.4 g/l KCl, 1.0 g/l glucosio), il gradiente formatosi è stato quindi centrifugato a 65 giri per 5 min senza uso di freni e con bassa accelerazione. I protoplasti interi si raccolgono all’interfaccia tra le 2 fasi, mentre i detriti cellulari si depositano sul fondo. I protoplasti sono stati raccolti prelevandoli, con una pipetta tagliata, dalla fase superiore, evitando la fase inferiore; ottenendo aliquote da 3 ml. Alle aliquote sono stati aggiunti 8 ml di soluzione di lavaggio W5 e centrifugati a 65 giri per 5 min. I protoplasti depositati sul fondo sono stati risospesi con 5 ml della soluzione K3 e infine riposti a 4 °C al buio per 2 ore, ponendo i tubi in posizione orizzontale, per favorire l’aerazione della soluzione.

4.3.2 Immunolocalizzazione con metodo DAB e a fluorescenza

A 500 μl di protoplasti isolati è stato aggiunto ugual volume di paraformaldeide al 8% disciolta in PBS 1X e due gocce della sospensione sono state lasciate ad asciugare su vetrini Super Frost® Plus “overnight”. I protoplasti sono stati poi reidratati per 10 min in PBS 1X e trattati con Metanolo/Acetone 1:1 per eliminare la clorofilla. Le perossidasi endogene sono state poi disattivate con un trattamento con H_2O_2 allo 0,75% in PBS 1X per 10 min. Allo scopo di saturare i siti di legami aspecifici, ai protoplasti è stata aggiunta la soluzione di “blocking” (10% Normal Goat Serum, 0,4% Triton in PBS 1X) per un’ora, e sono stati incubati “overnight” con la soluzione di “blocking” addizionata con l’anticorpo primario anti-myc 1:600 (Santa Cruz). Successivamente, per la localizzazione tramite il metodo colorimetrico della diaminobenzidina (DAB), i vetrini sono stati lavati per tre volte per 10 minuti con PBS 1 X e incubati con l’anticorpo secondario Anti-rabbit biotinilato 1:300 nella soluzione di “blocking” per 1 ora a temperatura ambiente. In seguito a 3 lavaggi di PBS 1X per

10 minuti, ai vetrini è stato addizionato il substrato del VECTASTAIN Universal Elite ABC secondo le istruzioni della casa produttrice.

I vetrini invece per la localizzazione tramite microscopia confocale sono stati incubati con l'anticorpo secondario anti-rabbit-Alexa-488 per due ore a temperatura ambiente e poi lavati con PBS 1X per due volte per 10 min. L'osservazione dei protoplasti è stata eseguita tramite microscopio Zeiss Axiovert 200 (con un obiettivo 40x/0.75 Plan-Neofluar) associato ad un sistema laser scanning confocal (LSM Pascal, Zeiss). L'eccitazione è stata prodotta mediante una lampada a mercurio e mediante laser Argon 488 nm di lunghezza d'onda, (10% di potenza) e l'emissione dell'Alexa 488 è stata raccolta in una finestra tra 505 a 530 nm.

4.4 Saggi biologici con spore di *Botrytis cinerea*

Piante transgeniche Sp-ank-kdel e piante di tabacco non trasformate *wild type*, allevate *in vivo* sono state sottoposte a saggi biologici di resistenza al patogeno *Botrytis cinerea*, disponibile sotto forma di spore presso la Micoteca del Dipartimento di Patologia Vegetale dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II". Sono state utilizzate 2 piante per ciascun genotipo. Sono state prelevate 2 foglie/pianta per un totale di 4 foglie/genotipo. Su ogni foglia sono stati eseguiti 4 inoculi, per un totale di 16 inoculi/genotipo. Il patogeno è stato utilizzato alla concentrazione di 1×10^5 spore/ml di tampone di germinazione (20 mM glucosio-20 mM KH_2PO_4) con inoculi, del volume di 20 μl effettuati negli spazi internodali. Il saggio è stato condotto in camera di crescita nelle seguenti condizioni sperimentali: temperatura 20-22°C; umidità 75-90%; fotoperiodo 16 ore di luce e 8 di buio. Dopo 48 h dall'inoculo si è osservata la formazione delle prime lesioni rilevabili. I successivi rilevamenti sono stati fatti a distanza di 24 ore.

4.5 Saggi biologici con *Heliothis virescens*

Piante del genotipo Sp-ank-kdel 1, Sp-ank-kdel 4, Sp-ank-kdel 35 e piante di tabacco non trasformate NN, sono state sottoposte a saggi biologici di resistenza al lepidottero *Heliothis virescens*. I biosaggi sono stati condotti presso i laboratori della Sezione di Entomologia del Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie, Università della Basilicata. Il nottuido è stato allevato in ambiente controllato a temperatura di $27^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperiodo di 18 h di luce e 6 h di buio.

Larve neonate sono state preliminarmente alimentate con tabacco di controllo per standardizzare la fisiologia digestiva. Successivamente, al raggiungimento del quarto giorno di vita, sono state prelevate a caso 192 larve, di cui 64 per ciascun genotipo vegetale.

Le larve sono state pesate a giorni alterni durante l'intero periodo di allevamento. Al decimo giorno di vita si è provveduto a sostituire i contenitori multicella con altri più grandi. In tali contenitori è stato proseguito e terminato il biosaggio fino al raggiungimento dello stadio di crisalide.

4.6 Analisi microarray

4.6.1 Induzione della SAR e produzione delle reazioni di ibridazione

Sono stati realizzati tre differenti set di semine contemporanee per la linea transgenica AnkKDEL 1 e la linea *wild type* (NN) a una settimana di differenza l'uno dall'altro. Ad un mese dalla semina i germogli sono stati trasferiti in plateau *in vivo* e trascorsi 10 giorni in vasi più grandi. Dopo ulteriori 30 giorni le piante sono state sottoposte a induzione della SAR tramite capsiceina. Tale sostanza, fornita dal dott. Michel Ponchet, Unite Interactions Plantes-microorganisms INRA (Antibes) France

(Bourque *et al.*, 1998), purificata e liofilizzata da *Phytophthora capsici* (strani 147) lotto numero 5, è stata risospesa in acqua a una concentrazione finale di 1 mg/ml. Le piante di tabacco, 4 per ciascun genotipo, per un totale di 8 piante per set, sono state decapitate in modo da rimuovere l'apice con le foglie più giovani, con un taglio parallelo al suolo. Sul punto di taglio sono stati applicati 40 µl di della soluzione e se ne è atteso il completo assorbimento. Trascorse circa 24 ore dall'induzione, il materiale fogliare è stato raccolto dalle piante numerando le foglie progressivamente dal punto di taglio fatta esclusione della foglia N°1 che non è stata prelevata. Per ciascun genotipo le foglie N°2 prelevate dalle 4 piante indotte sono state macerate insieme in azoto liquido; si è quindi proceduto all'estrazione dell'RNA con Trizol Reagent (Invitrogen) secondo il protocollo fornito dalla casa produttrice. L'RNA è stato risospeso in 20 µl di H₂O sterile e la qualità dell'RNA è stata valutata tramite corsa al capillare 2100 Bioanalyzer (Agilent).

4.6.2 Disegno del "chip" e ibridazione

L'analisi trascrittomica è stata condotta su 90K TobaccoArray1.0 sintetizzato tramite tecnologia CombiMatrix presso il Plant Functional Genomics Center dell'Università degli studi di Verona (<http://ddlab.sci.univr.it/Functional-Genomics/>). La tecnologia CombiMatrix combina la chimica dei fosforamiditi e semiconduttori per il controllo digitale della sintesi delle sonde sulla superficie del "chip". Il 90K TobaccoArray contiene 90000 elettrodi che supportano la sintesi *in situ* di 20200 sonde uniche di 35-40 mer di DNA per quattro repliche all'interno del "chip". Le sonde sono state disegnate per individuare i singoli *Tentative Consensus* (TCs) disponibili nel database TIGR Gene Index Release 11 usando OligoArray 2.1 (Rouillard *et al.*, 2003). Nove sequenze di oligonucleotidi batterici sono state utilizzate come controllo negativo. Le quattro repliche di ogni sonda sono randomizzate all'interno dell'"array" per controllare la variabilità interna. 1 µg del RNA totale è stato utilizzato come template per la sintesi dell'RNA antisenso (aRNA) tramite SuperScript™ Indirect RNA Amplification System Kit (Invitrogen) incorporando il fluorocromo Alexa Fluor 647. La pre-ibridazione, la frammentazione del RNA, l'ibridazione dei 3 µg del aRNA marcato e i lavaggi del "chip" sono stati effettuati seguendo i protocolli forniti da CombiMatrix (http://www.combimatrix.com/docs/PTL020_00_90K_Hyb_Imaging.pdf). Il microarray è stato quindi sottoposto ad ibridazione e lavaggio. Prima dell'acquisizione dell'immagine tramite Perkin Elmer ScanArray 4000XL, al microarray è stato aggiunto l'"imaging solution" ed è stato ricoperto con LifterSlip™. Le immagini sono state acquisite tramite il software ScanArray Express Microarray Analysis System v4.0 e processate per estrarre i dati grezzi con CombiMatrix Microarray Imager Software v5.8.0. Le mediane delle singole sonde e la deviazione standard sono state importate nel software SPSS, e la normalizzazione è stata effettuata rapportando il segnale della singola sonda con la media del microarray. Dopo la normalizzazione e controllo della qualità, tutti i valori sono stati convertiti in log base 2.

4.6.3 Analisi bioinformatica

Le sequenze dei Tentative consensus (TC) dei geni risultati modulati dall'analisi del microarray sono state ottenute dal sito del Gene Index Project (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>). I TC sono stati sottoposti in BLASTx ricercando similarità di sequenza nelle proteine di *Arabidopsis thaliana* nel database Non redundant sequence proteins (nr) di NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/x>) richiedendo un E-value < 10⁻⁶. Per ogni gene ricercato nella banca dati, è stata

selezionata la proteina con maggiore similarità di sequenza tramite l'e-value e convertita nella corrispondente sequenza nucleotica di *Arabidopsis thaliana* utilizzando il sito del TAIR <http://www.arabidopsis.org/tools/bulk/go/>. L'annotazione computazionale dei dati è stata effettuata con il software Blast2GO v.2.3.6 (<http://www.blast2go.org>). La banca dati Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG: <http://www.genome.jp/kegg/>) è stata consultata per ricercare le proteine enzimatiche annotate nelle principali vie metaboliche.

4.7 Analisi Real Time RT-PCR

L'analisi Real Time RT-PCR è stata condotta tramite ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem) in un volume totale di 25 µl contenenti 12,5 µl 2X of Power Syber Green PCR Master Kit (Applied Biosystem), 0,3 µl del cDNA a e 0,35 µM di ogni specifico primers. Il programma per l'analisi d'espressione prevede 2 minuti a 50°C, 4 minuti a 95°C, 40 cicli di 15 secondi a 95°C e a 1 minuto temperature di "annealing" dei singoli primers (Tab.2). L'analisi d'espressione è stata condotta per le tre repliche biologiche e ogni singola amplificazione è stata ripetuta in triplicato all'interno della stessa piastra. Inoltre è stata inclusa nell'analisi anche la curva di dissociazione (15 secondi a 95°C, 15 secondi a 58°C e denaturazione per quindici secondi a 95°C) e confrontata con le temperature di melting di ogni singola coppia di primers. I prodotti dell'amplificazione sono stati controllati tramite elettroforesi su gel d'agarosio al 2% colorato con etidio bromuro. I dati ottenuti dall'amplificazione sono stati analizzati tramite 7000 System Sequence Detection Software (Applied Biosystem), utilizzando il metodo comparativo dei Ct con la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001) dove:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gene target} - Ct \text{ controllo endogeno} \quad \Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ campione} - \Delta Ct \text{ calibratore}$$

L'actina di *N. tabacum* è stata usata come riferimento endogeno e usato per normalizzare l'espressione dei geni d'interesse in Tabacco

4.7.1 Disegno dei primers

I primers specifici per i geni analizzati riportati in Tab. 2 sono stati utilizzati per l'analisi d'espressione nelle piante transgeniche e *wild type* in tabacco. I primers sono stati disegnati con il programma Primer Express 2.0 Software (Applied Biosystems). Il frammento da amplificare è stato scelto fra una lunghezza di 80 a 150 bp.

Tab. 2: Primers utilizzati nell'analisi Real Time-PCR

PRIMERS	SEQUENCE (5' – 3')	GENE	A. N. UNIPROT	Ta °C	L. A. (bp)
QuinRed_For	GGTGCTGAAACCAATAAATATGTTTC	Quinone reductase-like protein	Q9LXZ4	57	105
QuinRed_Rev	CCCACAATTTTCCCAAGTACG			57	
DnaJ_For	TGCGGCAGATTTTAGCAATG	DnaJ	Q8H0G6	57	110
DnaJ_Rev	GGAATAACCTGTCCAAGATAC			57	
Aconit_For	GCAGAAAGAGAGAGCTTCTC	Aconitase	Q84NI5	57	150
Aconit_Rev	GGTATGTTGCTATCAGTTGGC			57	
Pr4a_For	AGAGCCGTTTAGAATAAGAAGG	Pr4a	P29062	57	145
Pr4a_Rev	GTGGTGCTTCATTCATTCAATC			57	
Gluc_For	CAGCAAACATGCAACCAAAGTA	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	P36401	57	130
Gluc_Rev	CAGTACATAGTGCCAATGGAC			57	
ProtInib_For	GGTGGTCCTGTTACAGAAGA	Proteinase inhibitor I-A	Q03198	57	150
ProtInib_Rev	AGAGATTAACCATACAGCTCC			57	
Metallnib_For	CGGACAAGTGGCAGACTTTA	Metalloprotease inhibitor	Q9SBH8	57	120
Metallnib_Rev	CAACAACAATTACAAGAAGAGC			57	
Osmotin_For	CTATCGACACGTTAGTGTAAGAC	Osmotin	P14170	57	115
Osmotin_Rev	GTGACTCTTATTCAGGTCTTAGG			57	

A.N.: "accession number", **L.A.:** lunghezza amplicone

5. RISULTATI

5.1 Analisi della sequenza *TnBVank1* e omologie in banca dati

L'intera sequenza del gene *TnBVank1* codifica per una proteina di 155 aminoacidi (Uniprot Accession Number Q5GR55) il cui punto isoelettrico teorico è pari a 5,87 ed il peso molecolare 17,5 KDa. L'analisi con SMART ha identificato 3 differenti domini ankirina (aminoacidi 54-86; 91-121; 125-154). L'allineamento con proteine del regno vegetale ha dato invece degli score poco significativi ma tra le proteine con maggiore similarità di sequenza è stata identificata la proteina *NtANK1* di tabacco (E-value 0.0030, identità del 27% e positivi 52%) e l'ortologa di Arabidopsis *AtAKR2* (E-value 0.0070, identità del 26% e positivi 51%). In figura è mostrato l'allineamento tra la proteina virale e le omologhe IκB di tabacco e arabidopsis. La sequenza proteica di *TnBVANK1* è stata allineata anche a NPR1 di Arabidopsis, una proteina chiave della risposta sistemica acquisita, che in letteratura è stata descritta come IκB simile. Tra le due proteine la similitudine è molto bassa (identità del 5,4 %; Fig.7).

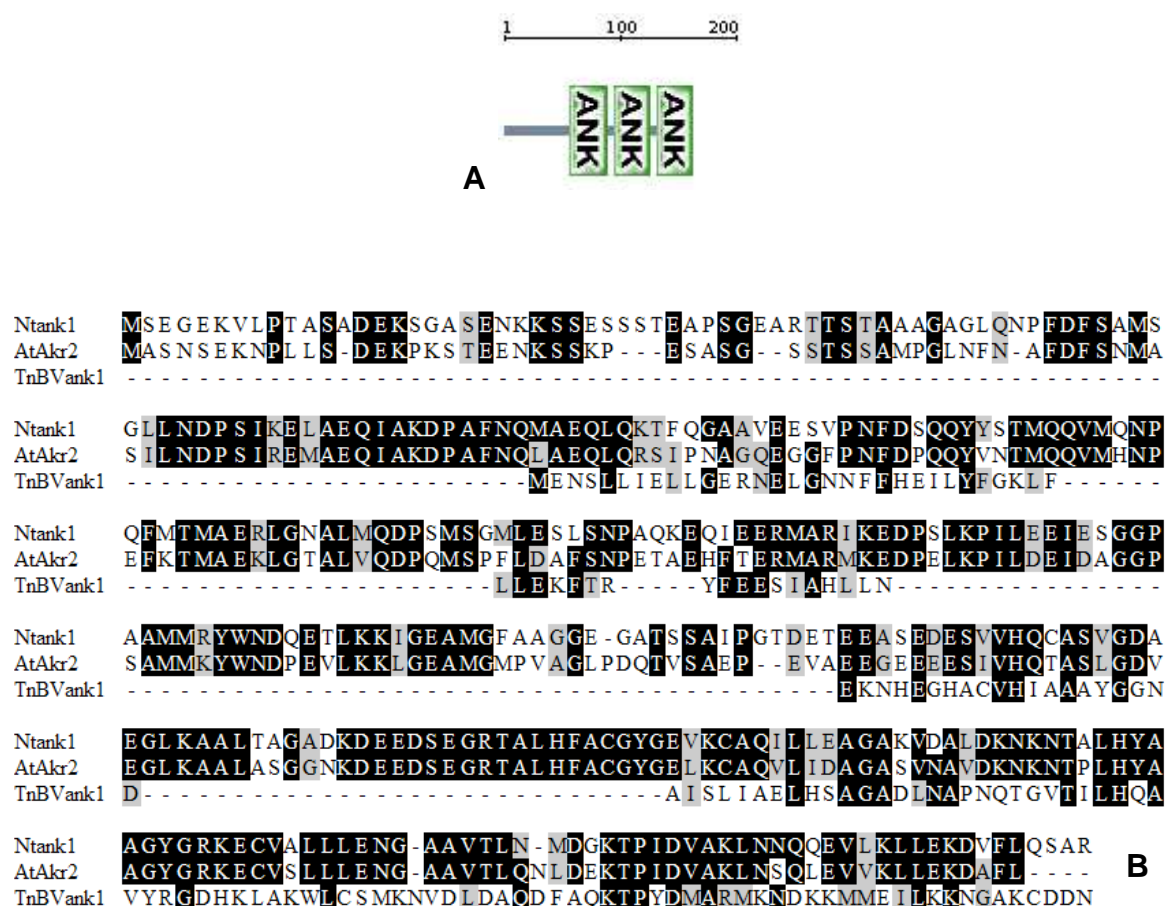




Fig. 7.: **A:** Domini ankirina presenti nella proteina virale evidenziati dalla SMART analisi. **B e C:** Allineamento tramite ClustalW e BOXSHADE della proteina *TnBVANK1* con due lkb caratterizzate nel sistema vegetale: *NtANK1* di *Nicotiana tabacum* (Q8H6P9) e *AtAKR2* di *Arabidopsis thaliana* (Q9SAR5) e *NPR1* di *Nicotiana tabacum* (Q2L7G0).

5.2. Caratterizzazione molecolare delle piante transgeniche

5.2.1 Analisi RT-PCR

L'RNA totale è stato isolato da alcune piante Sp-ank-kdel presenti *in vivo*. Il rapporto A_{260}/A_{280} è risultato per tutti i campioni compreso tra 1.7 e 2.0. È stato inoltre eseguito un controllo dell'integrità dell'RNA tramite elettroforesi su gel di agarosio in condizioni denaturanti. I campioni di RNA hanno presentato bande nette corrispondenti agli RNA ribosomiali come è possibile osservare in figura 8.

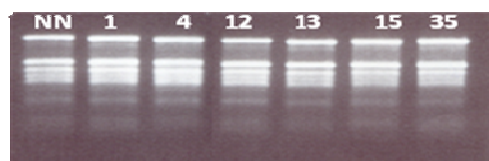


Fig.8.: Separazione su gel d'agarosio denaturante dell'RNA totale estratto dalla pianta non trasformata (NN) e dalle piante transgeniche Sp-ank-kdel (1, 4, 12, 13, 15, 35).

La qualità del cDNA è stata verificata tramite RT-PCR con *primers* specifici per il gene del fattore di elongazione *Elongation Factor 1-alpha* (*EF 1-α*). I *primers* sono stati disegnati per annilare su due esoni consecutivi per verificare la presenza di possibile contaminazione di DNA genomico. La lunghezza dell'amplificato dal cDNA è di 422 bp, invece un amplificato più lungo è dovuto dalla presenza nel campione di DNA. Le dimensioni dell'amplificato dimostrano l'assenza di contaminazione da DNA genomico (Fig.9).

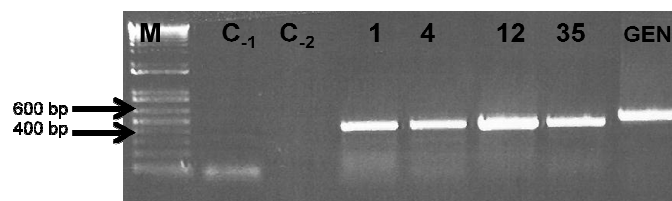


Fig.9.: Amplificazione RT-PCR del gene *EF1α* di piante transgeniche e NN. M: marker 1 kb-plus DNA ladder (Invitrogen); C-₁: controllo negativo della RT-PCR; C-₂: PCR controllo negativo della PCR; GEN: DNA genomico; 1, 4, 12, 35: piante Sp-ank-kdel.

L'amplificazione con *primers* specifici per il gene *TnBVank1* ha prodotto un frammento di 500bp, pari alle dimensioni del gene virale, rivelando la presenza del trascritto nelle linee trasformate analizzate (Fig.10).

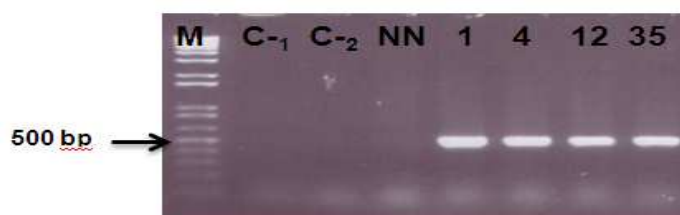


Fig.10.: Amplificazione RT-PCR del gene *TnBVank1*. M: marker 1 kb-plus DNA ladder (Invitrogen); C-₁: controllo negativo della RT-PCR; C-₂: controllo negativo della PCR; NN: pianta non trasformata; 1, 4, 12, 35: piante Sp-ank-kdel.

5.2.2 Analisi western blotting degli estratti proteici totali delle piante transgeniche

La presenza della proteina eterologa è stata verificata mediante analisi western delle proteine totali estratte da foglie di piante. Le proteine totali sono state estratte con buffer denaturante e analizzate in SDS gel-elettroforesi (Fig.11). Tale analisi ha rivelato la presenza della proteina di peso molecolare atteso oltre ad aggregati complessi di peso molecolare più elevato e persistente anche dopo la bollitura del campione (Sp-ank-kdel). I pattern a bande multiple potrebbero essere la conseguenza delle interazioni della proteina transgenica con le proteine di membrana del reticolo endoplasmico mediate dai domini ankirina che presiedono alle interazioni proteina-proteina (Sedgwick e Smerdon, 1999). Questa ipotesi è compatibile con la struttura di *TnBVANK1* che presenta un dominio ankirina molto esteso, costituito da tre ripetizioni. Tuttavia, non è da escludere che la complessità del profilo osservato sia dovuto alla formazione di multimeri di *TnBVANK1* favoriti dalla condizione di eccesso quantitativo della proteina ricombinante. La proteina *TnBVANK1* presenta inoltre siti di sumoilazione, cioè di interazione con proteine SUMO (Small ubiquitine related modifier; Kurepa *et al.*, 2003); tale presenza potrebbe in parte giustificare la formazione di complessi resistenti alle condizioni denaturanti di preparazione degli estratti proteici.

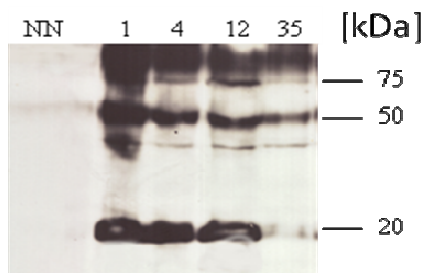


Fig.11: Western Blotting di estratti proteici (50µg) di linee transgeniche Sp-ank-kdel (1, 4, 12, 35). NN: controllo negativo dell'analisi western.

5.3 Immunolocalizzazione della proteina virale in protoplasti di tabacco

Allo scopo di valutare la localizzazione della proteina ricombinante, sono stati allestiti esperimenti di immunolocalizzazione su protoplasti isolati da foglie delle linee transgeniche Sp-ank-kdel 1 e controllo non trasformato. Per l'immunolocalizzazione sono stati utilizzati due protocolli diversi: osservazioni in campo chiaro tramite l'adozione di un anticorpo secondario biotinilato coniugato con una perossidasi e osservazione in fluorescenza con l'utilizzo di un anticorpo secondario coniugato con un fluorocromo. Le immagini, acquisite tramite i due protocolli, mostrano che la proteina ricombinante è associata alle membrane cellulari (Fig. 12). Questo risultato concorda con quanto osservato per AKR2, proteina coinvolta nella regolazione del livello di perossido di idrogeno, che interagisce con APX3, enzima associato alla membrana dei perossisomi (Shen *et al.*, 2010), per la quale è riportata la localizzazione nel citosol e la sua associazione con i cloroplasti (Bae *et al.*, 2008).

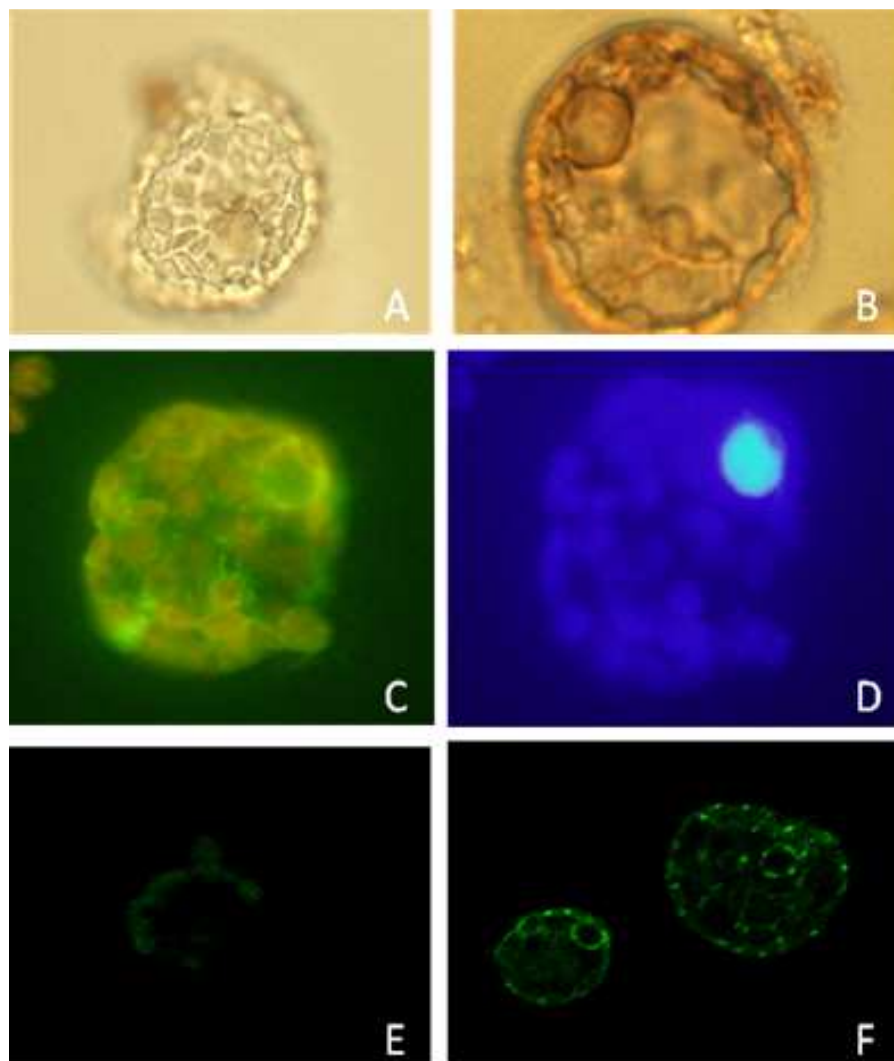


Fig.12.: “Immunodetection” della proteina virale sui protoplasti estratti dalle foglie del controllo *N. tabacum* (NN) e la linea transgenica Sp-ank-kdel 1. A e B: immunolocalizzazione con anticorpo secondario coniugato con perossidasi su *wild type* (A) e la linea transgenica (B). C e D: co-immunolocalizzazione della proteina eterologa con osservazione con un anticorpo secondario coniugato con Alexa 488 (C) e con colorante DAPI (D). E e F: osservazione a microscopia confocale su “wild type “ (E) e transgenica (Sp-ank-kdel 1).

5.4 Saggi biologici con larve di *Heliothis virescens*

Biosaggi di resistenza a *Heliothis virescens*, ospite naturale del *Toxoneuron nigriceps*, sono stati condotti in collaborazione con il Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Vegetali dell'Università di Potenza. Larve dei lepidotteri sono state allevate su dischi fogliari di piante appartenenti ai genotipi controllo, Sp-ank-kdel 1, Sp-ank-kdel 4 e Sp-ank-kdel 35. Il peso delle larve e il numero delle larve vive sono stati monitorati a giorni alterni. I risultati ottenuti sono stati sottoposti ad elaborazione statistica (Fig.13). È stato riscontrato una diminuzione e un rallentamento dell'accrescimento ponderale delle larve allevate sulle piante transgeniche in confronto a quelle allevate sul tabacco non trasformato. Tale differenza risulta visibile dopo 7 giorni di dieta artificiale ed è massima dopo 11 giorni. Dopo 13 giorni si osserva una diminuzione del peso ponderale delle larve allevate sul controllo e non si osservano differenze tra controllo e linee trasformate.

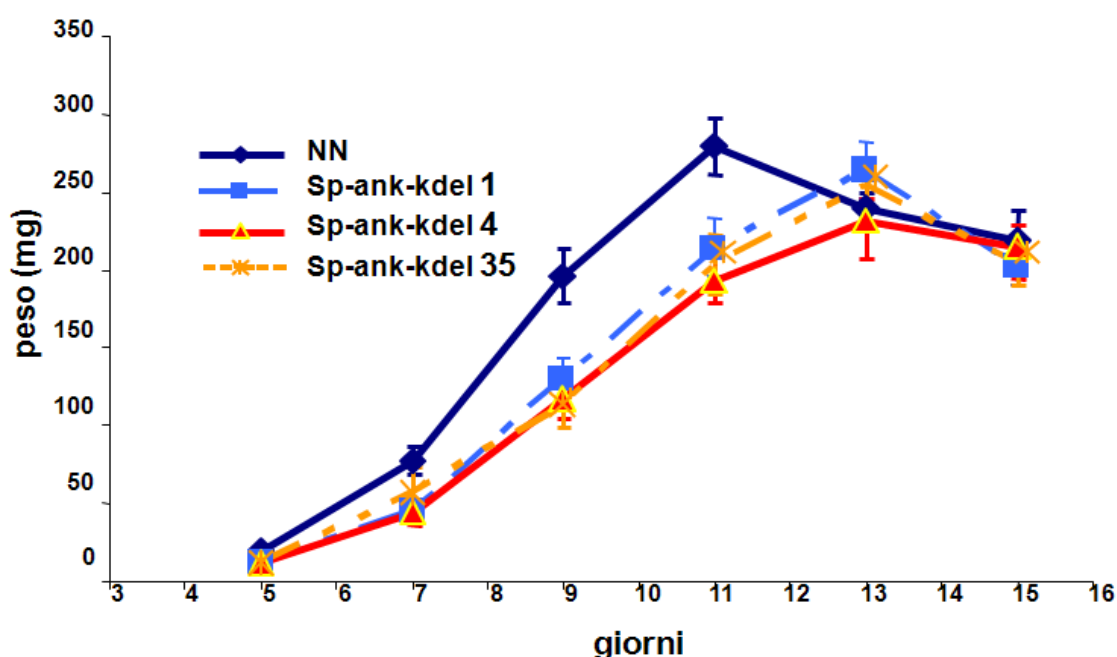


Fig.13: Curva di crescita delle larve allevate sui genotipi transgenici e *wild type* (NN). I grafici rappresentano i valori mediati di due repliche biologiche. Sull'asse x sono indicati i giorni, sull'asse delle y il peso delle larve.

5.5 Biosaggi di resistenza al fungo fitopatogeno *Botrytis cinerea*

Le piante dei genotipi Sp-ank-kdel sono state sottoposte, a saggi biologici con il fungo necrotrofo *Botrytis cinerea* in collaborazione con il Dipartimento di Patologia dell'Università di Napoli Federico II. Trascorse 72 ore dall'inoculo delle spore fungine, è stata osservata la formazione delle prime lesioni rilevabili (Fig.14). Da tale analisi le linee transgeniche sono risultate più suscettibili al patogeno rispetto alle piante controllo. Inoltre le differenze delle aree necrotiche tra i controlli e i genotipi transgenici sono statisticamente significative dall'analisi ANOVA.

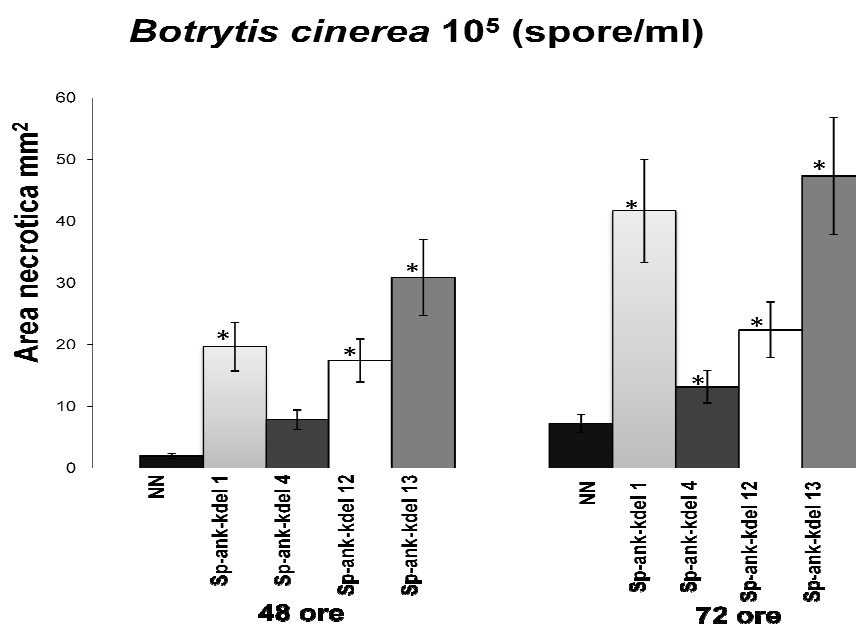


Fig.14.: Sviluppo delle aree necrotiche a 48 e 72 ore nelle linee transgeniche (Sp-ank-kdel1, 4, 12, 13) e *wild type* (NN) in seguito ad inoculazione con spore di *Botrytis cinerea*. *:P<0.05 differenze significative

5.6 Induzione delle risposte di difesa

Piante transgeniche Sp-ank-kdel 1 e piante *wild type* cv Samsun, sono state allevate in camera di crescita in condizioni di temperature controllate evitando qualsiasi forma di stress. Alla 10^{ma} settimana (Fig. 15a) una parte delle piante sono state cimate e sul punto di taglio è stata applicata la capsiceina, un induttore fungino della SAR (Bonnet *et al.*, 1996). A 24 ore dall'induzione, le piante di tabacco capitozzate ed elicitate con la capsiceina hanno mostrato in corrispondenza della superficie di taglio e di assorbimento della capsiceina, un evidente imbrunimento dei tessuti dell'apice con forma concava al centro (Fig. 15c). Tali sintomi non sono stati riscontrati nelle piante utilizzate come controllo negativo dell'induzione trattate con la sola acqua sterile. A 24 ore è stata prelevata la seconda foglia dopo il taglio e utilizzata per l'estrazione dell'RNA totale.

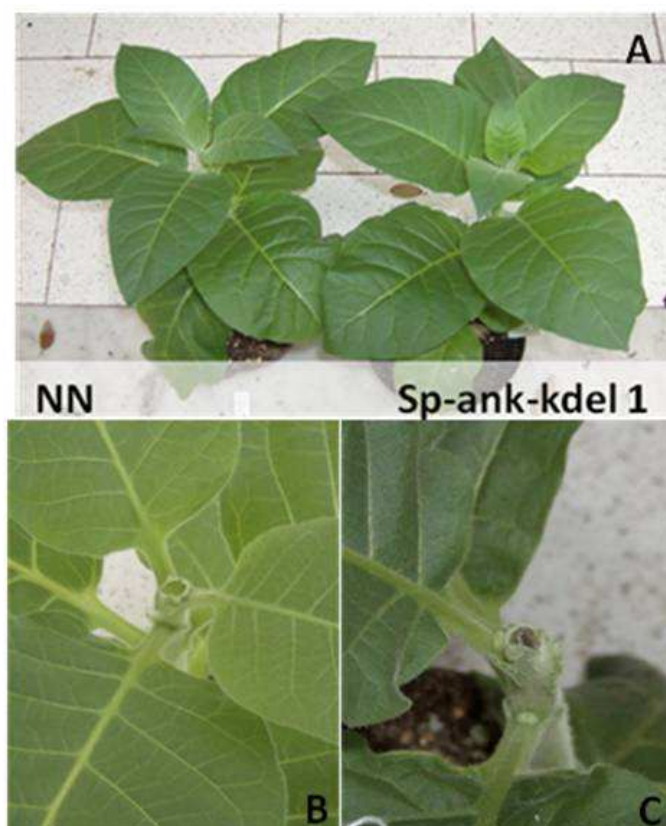


Fig.15.: A) Stadio di sviluppo delle piante *wild type* (NN) e transgeniche utilizzate per l'analisi d'espressione, B) Taglio, C) Taglio e imbrunimento dei tessuti nelle piante trattate con capsiceina dopo 24 ore

5.7 Controllo qualità dell'RNA e estrazione dei dati microarray

L'integrità dell'RNA estratto da foglia è stata verificata analizzandone circa 50-100 ng con il chip RNA 6000 nano assay (Agilent) associato allo strumento Agilent 2100 Bioanalyzer. In seguito all'analisi della qualità (Fig.16) si è proceduto alla sintesi del cDNA e alla marcatura con fluorocromo Alexa 647. La valutazione dell'avvenuta incorporazione del fluorocromo è stata valutata tramite spettrofotometro e sono stati utilizzati per l'ibridazione solo campioni con incorporazione non inferiore al 30%.

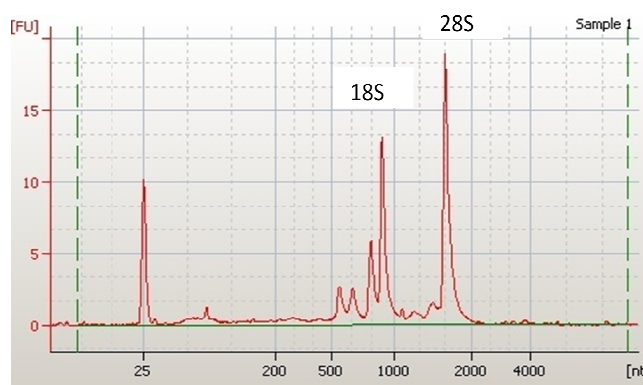


Fig.16: Elettroferogramma dell'RNA totale estratto da foglia. La qualità dell'RNA è valutabile tramite il confronto delle aree dei picchi corrispondenti al RNA ribosomiale 28S e 18S.

Dopo la marcatura e l'ibridazione, la scansione con lo strumento Perkin Elmer ScanArray 4000XL e l'analisi relativa con il programma Express Microarray Analysis System v4.0, ha evidenziato l'assenza di rumore di fondo e l'avvenuta colorazione

degli spot sul chip. Il controllo allo scanner dell'ibridazione ha evidenziato la presenza di spot uniformi per taglia ed intensità.

I dati, acquisiti tramite Software Combimatrix, sono stati sottoposti a normalizzazione ed elaborazione statistica tramite Excel e le tre repliche biologiche hanno evidenziato una correlazione superiore allo 0.90 (Tab. 3).

Tab.3: Correlazione tra le tre repliche biologiche

Repliche biologiche	Wild type	Sp-ank-kdel 1	Wild type+Cap	Sp-ank-kdel 1+Cap
1 vs 2	0,95	0,96	0,93	0,91
2 vs 3	0,96	0,95	0,97	0,92
1 vs 3	0,94	0,96	0,93	0,93

5.8 Analisi microarray

5.8.1 Geni differenzialmente espressi nelle piante "wild type" trattate con capsiceina

In prima istanza sono stati analizzati i geni modulati nelle piante non trasformate elicitate con capsiceina per verificare l'avvenuta induzione della SAR. Un totale di 126 geni ha mostrato una variazione di espressione: 90 geni sono risultato sovraespressi e 36 geni sono risultati sottoespressi. Date le annotazioni funzionali disponibili per Arabidopsis, le sequenze delle ESTs di Tabacco usate per la sintesi delle sonde del microarray sono state ricercate nel database di Arabidopsis e i geni con maggiore omologia di sequenza sono stati selezionati. I geni di Arabidopsis sono stati poi annotati tramite il "software" Blast2GO. I geni per i quali non era disponibile l'annotazione funzionale sono stati annotati manualmente consultando la letteratura. L'annotazione funzionale ha evidenziato che tra i geni sovraespressi 13 geni tra cui *PR1*, chitinasi, peptidasi, inibitori di proteasi e defensine, sono coinvolti direttamente nelle risposte di difesa, 11 geni, tra cui ascorbato perossidasi, citocromo p450, NADH deidrogenasi, sono coinvolti nel *burst* ossidativo, 4 nel rimodellamento della parete cellulare, pectin metilesterasi, cellulasi, proteine ricche di cisteine, glucanasi, (Appendice Tab A1 e A2). Il numero di geni sottoespressi è risultato di gran lunga inferiore (36). La distribuzione funzionale dei geni up-regolati e down-regolati è mostrata in figura 17 .

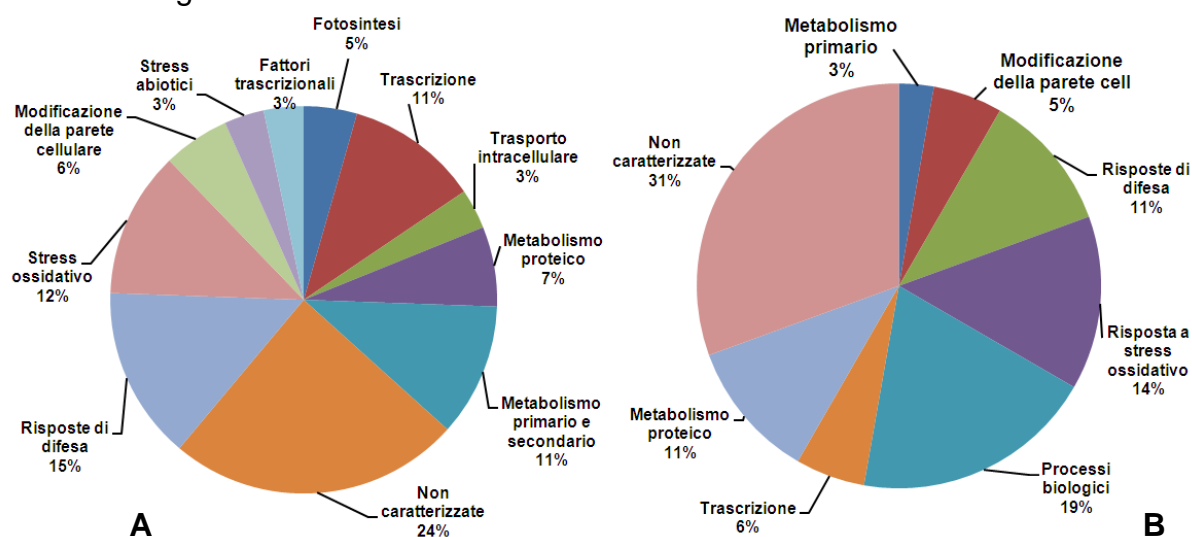


Fig. 17.: Distribuzione funzionale secondo le categorie funzionali di *Gene ontology* dei geni up-regolati (A) e down-regolati (B) nel genotipo *wild type* in seguito a trattamento con capsiceina

5.8.2 Geni differenzialmente espressi nelle piante transgeniche trattate con capsiceina

Lo studio dei geni differenzialmente espressi nella linea transgenica Sp-ank-kdel 1 rispetto controllo non trasformato, a seguito di trattamento con l'elicitore fungino, ha evidenziato la modulazione di 90 geni, dei quali diciotto sovraespressi e ben 72 sottoespressi. L'annotazione funzionale ha mostrato che tra i geni sovraespressi sono presenti otto geni che sono coinvolti nelle risposte di difesa quali *PR1a*, *PR1b* e *PR2*, geni che codificano per inibitori di proteasi, osmotina, *PR4* e *PR10-like*. Anche tra i geni down regolati è presente un numero elevato di geni coinvolti nella difesa quali defensine, geni coinvolti nella modifica dello stato ossidativo, nella morte cellulare programmata e nel metabolismo secondario.

Nella figura 18 sono mostrate le distribuzioni dei geni up e down-regolati nelle piante transgeniche trattate. L'elenco dei geni differenzialmente espressi è in appendice (Tab A3 e A4).

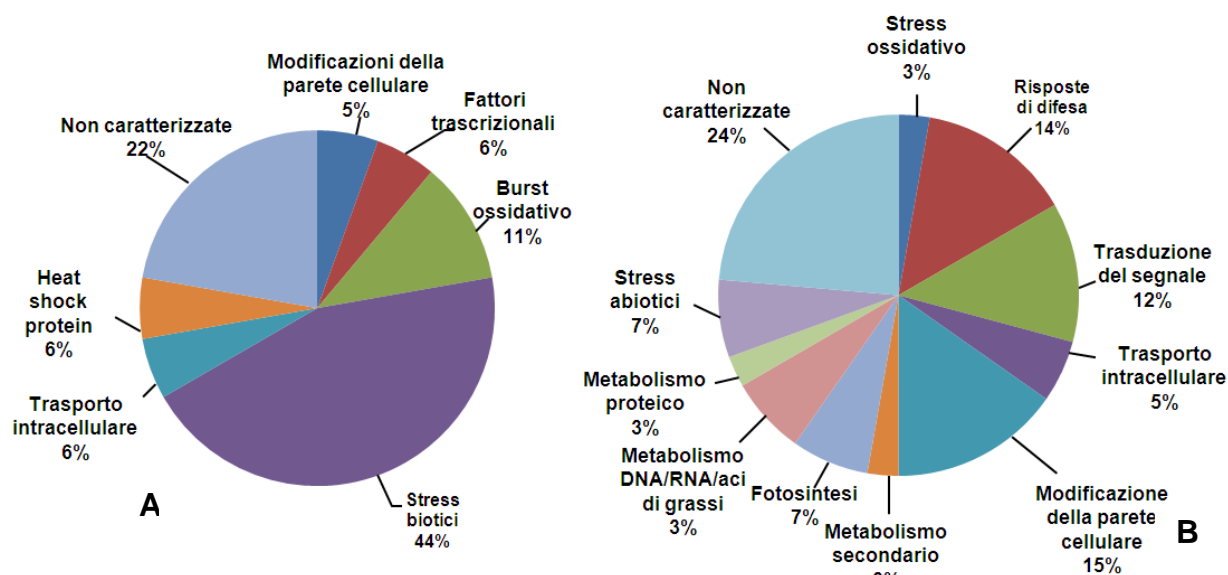


Fig.18.: Distribuzione funzionale dei geni up-regolati (A) e down-regolati (B) nella linea transgenica Sp-ank-kdel 1 in seguito a trattamento con capsiceina

5.8.3 Confronto tra ESTs differenzialmente espresse

Per indagare l'impatto del transgene sulla modulazione dell'espressione di ESTs di tabacco a seguito della attivazione della SAR, i pattern d'espressione genica evidenziati nelle linee trasgeniche sono stati confrontati con quelli evidenziati nei controlli non trasformati. L'analisi ha mostrato che 54 ESTs sono in comune tra i due set di dati (Fig.19). Delle 54 sequenze la cui espressione è risultata modulata nei transgenici e nei controlli 47 sono risultate sottoesprese nei primi e sovraesprese nei secondi (Tab. 4). Solo quattro geni sono risultati sovra espressi sia nelle piante transgeniche che nei controlli a *wild-type* che nella linea transgenica (*PR1*, *PR4*, *cystein rich protein*, *un gene non caratterizzato*). La distribuzione dei geni in comune tra i due set è mostrata in tabella.

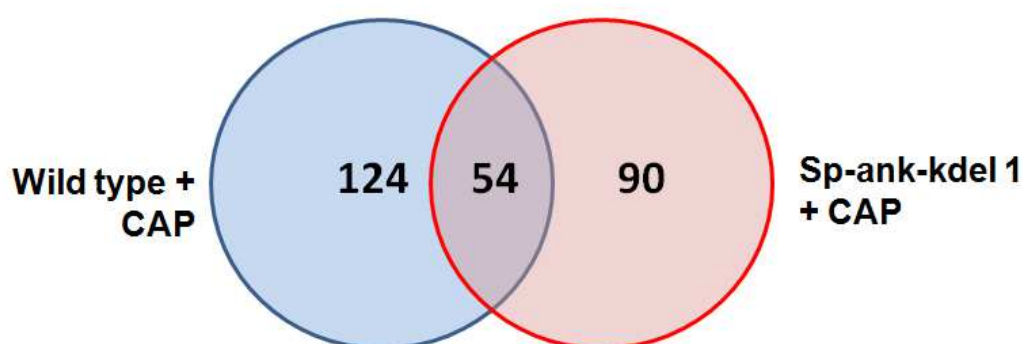


Fig.19.: Diagramma di Venn con geni coinvolti nelle risposte all'elicitazione della SAR in piante transgeniche e *wild type*

Tab. 4: Distribuzione dei geni differenzialmente espressi in comune tra il genotipo Sp-ank-kdel 1 e *wild type* in seguito all'elicitazione delle risposte di difesa

Confronti dell'espressione genica	Numero di geni
Geni up regolati in wild type+cap e in Sp-ank-kdel 1+ cap	4
Geni up regolati in wild type+cap e down regolati in Sp-ank-kdel 1+ cap	47
Geni down regolati in wild type+cap e up-regolati in Sp-ank-kdel 1+ cap	3
Geni down regolati in wild type+cap e down regolati in Sp-ank-kdel 1+ cap	0

Le 47 sequenze sottoesprese codificano per proteine coinvolte nel rimodellamento della parete cellulare (pectinmetilesterasi e cellulasi) o nella biosintesi della lignina (caffeoato-o-methyltrasferasi), oltre che per fattori trascrizionali (f-box protein, CHORD protein), proteine coinvolte nel *burst* ossidativo, (NADH deidrogenasi) e trasporto intracellulare (clathrin protein) (Tab.5). Tale risultato suggerisce che *TnBVANK1* inibisce l'attivazione di geni coinvolti nelle risposte di difesa della pianta. È probabile che la sottoespressione di questi geni causi la suscettibilità delle linee transgeniche all'infezione di *Botrytis cinerea*.

Tab.5: Elenco delle ESTs differenzialmente espresse con funzione nota up-regolati in seguito ad elicitazione delle risposte di difesa nella *wild type* ma down regolate nella linea transgenica Sp-ank-kdel 1. AGI: *Gene Index Accession number*, TC: *tentative consensus*, FC: *fold change*.

AGI	TC	FC in NN+cap	FC in Sp-ank-kdel1+ cap	Gene
Risposte di difesa				
AT2G02100	TC8608	2.18	0.26	pcp17c2
AT4G20380	TC6356	3.38	0.28	zinc finger protein lsd1
AT1G19610	TC12331	3.55	0.33	defensin-like protein 19
AT4G37050	TC12824	2.71	0.4	patatin-like protein
AT3G57470	TC10576	3.07	0.4	peptidase m16 family protein
AT1G17860	TC5070	2.50	0.45	kunitz type trypsin and protease inhibitor
AT2G16430	TC10888	2.08	0.43	purple acid phosphatase
AT1G05760	TC10259	4.50	0.3	rtm1 protein
AT5G53110	TC13808	3.28	0.24	Protein
Modificazioni della parete cellulare				
AT2G32990	TC7109	2.62	0.38	glycosyl hydrolase family 9 :GH9
AT3G14310	TC9838	3.51	0.39	pectin methylesterase
AT3G05460	TC4705	4.69	0.41	mitochondria-associated cysteine-rich
Risposta a stress ossidativo				
AT3G51790	TC7584	3.71	0.31	cytochrome c-type biogenesis protein
AT5G43750	TC5857	4.59	0.34	nad h dehydrogenase 18
AT4G36090	TC11898	3.01	0.2	2og-fe oxygenase family protein
Fotosintesi				
AT1G54460	TC5574	4.03	0.35	tpx2 (targeting protein for xklp2)
AT1G45474	TC12641	2.10	0.37	photosystem i light harvesting complex
Trasduzione del segnale				
AT4G10840	TC9327	3.88	0.33	tetratricopeptide repeat domain-containing
AT5G13180	TC7486	3.62	0.33	nac domain
Trasporto intracellulare				
AT1G60970	TC9053	3.60	0.29	clathrin adaptor complex small chain family
AT2G40060	TC5190	2.17	0.43	clathrin light chain protein
Metabolismo primario, proteico e secondario				
AT1G08110	TC11075	3.89	0.35	lactoylglutathione lyase
AT1G52360	TC7780	2.98	0.42	coatamer subunit beta -3
AT5G53340	TC11379	2.68	0.37	beta- -galactosyltransferase 11
AT1G67250	TC9521	3.35	0.4	proteasome maturation factor ump1 family
AT1G04850	TC7483	2.16	0.49	ubiquitin-associated ts-n domain-containing
AT5G54160	TC4204	3.48	0.44	Caffeato 3-O-methyltransferase 1
Trascrizione				
AT2G03870	TC8995	3.47	0.2	Protein
AT2G26460	TC12082	3.70	0.29	splicing factor
AT2G26160	TC8148	4.22	0.36	f-box protein
AT2G01220	TC13366	3.22	0.37	Protein
AT3G15010	TC10208	2.92	0.49	rna recognition motif-containing protein

5.9 Validazione di geni differenzialmente espressi tramite Real Time RT-PCR

La validazione è stata condotta sulle tre repliche biologiche utilizzate per l'analisi *array*. Le piante *wild-type* (NN) sono state utilizzate come calibratore e quindi è stato assegnato il valore arbitrario RQ (*Relative Quantification*) di 1. Alcuni geni sono stati scelti per la validazione con l'analisi Real Time RT-PCR, interessanti in quanto coinvolti direttamente e indirettamente nelle risposte di difesa. In particolare sono stati selezionati i geni della *Pr4*, dell'inibitore di proteasi *PIN1*, *aconitasi*, *B-1,3-glucosidasi*, *quinone reduttasi*, *Dnaj*.

Le sequenze dei primers, disegnati con il programma Primer Express 2.0 Software (Applied Biosystems) sulle sequenze dei geni selezionati, sono state confrontate con banche dati TAIR ed blastn e tale analisi ha rivelato la mancanza di omologie con altri geni noti del regno vegetale. L'over-espressione nella linea transgenica di quattro geni è stata confermata tramite analisi Real Time RT-PCR ed le differenze con il controllo sono statisticamente significative (Fig.20 e Tab.6).

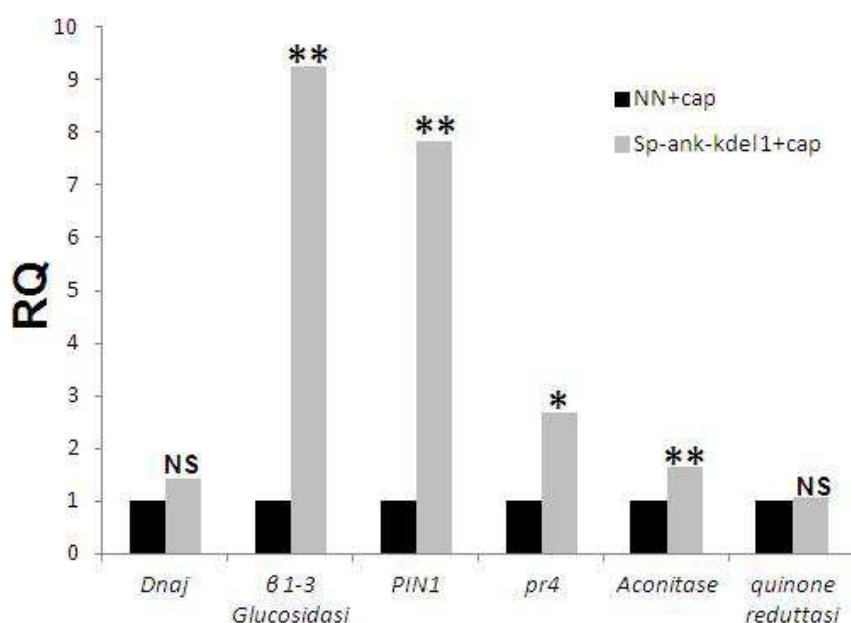


Fig.20: L'espressione relativa di alcuni dei geni up-regolati nelle linee transgeniche Sp-ank-kdel 1 in seguito ad elicitazione. Sull'asse x sono indicati i geni target, sull'asse delle y è la quantificazione relativa. NN: *wild type*. N.S: differenze non significative, *: $P < 0.05$ differenze significative, **: $P < 0.001$ differenze molto significative.

Tab.6.: Analisi del T test. RQ: *Relative Quantification* del gene nella linea transgenica rispetto al controllo. DEV STAN: deviazione standard tra i *change fold* delle tre repliche biologiche. T test: è stato condotto tra i Δct dei geni analizzati confrontando "wild-type" e piante transgeniche.

Gene analizzato	RQ	DEV STAN	T test
<i>Dnaj</i>	1,408995	0,364968618	0,125532
<i>β 1-3 Glucosidasi</i>	9,245	4,381543547	0,000038
<i>PIN1</i>	7,850	2,422228866	0,002
<i>pr4</i>	2,694	1,096208977	0,021
<i>Aconitase</i>	1,646	0,495421317	0,006
<i>quinone reduttasi</i>	1,065	0,307018883	0,336

I quattro geni che si sono confermati overespressi nel genotipo transgenico sono tutti coinvolti nelle risposte di difesa. È stato dimostrato che la proteina aconitasi regola la resistenza a stress ossidativo e la morte cellulare in *Arabidopsis* e *Nicotiana benthamiana*. Linee “knockout” di *Arabidopsis* per tale gene risultano essere più tolleranti allo stress ossidativo e mostrano una regolazione alterata delle risposta ipersensibile e morte cellulare in seguito a esposizione a patogeni (Moeder *et al.*, 2007). Gli altri tre geni overespressi codificano per proteine che appartengono alla famiglia delle PR proteins. (Van Loon *et al.*, 2006). Il gene che codifica per la Pr-4 risulta essere overespresso 2.6 volte nella linea transgenica. Le Pr-4 presentano un’attività chitinasica di tipi I e II, presentando in alcuni casi anche un’attività di ribonucleasi. In grano i geni delle Pr-4 sono attivati nelle piantine in seguito ad infezione di *F. culmorum* e dopo trattamento attivatori della SAR. Le PR-4 sono anche attive anche nei confronti de fitofagi e nematodi (Bertini *et al.*, 2006). Il gene che codifica per *Glucan-endo-1,3-β-glucosidasi* risulta essere invece overespresso di 9.2. Tale classe proteica appartiene alla famiglia delle PR-2, che degradano i β-1-3 glucani presenti nelle pareti fungine o gli stessi polisaccaridi della parete cellulare vegetale producendo elicitori che attivano la risposta ipersensibile (HR) (Beffa *et al.*, 1996). PIN1 appartiene alla famiglia degli inibitori della chimotripsina (Johnson *et al.*, 1989) e l’espressione in tabacco del gene *Pin1* di patata determina una maggiore resistenza a *Manduca sexta* (Ussuf *et al.*, 2001; Turrà e Lorito, 2011). Gli inibitori di proteasi legano e controllano l’attività delle proteinasi, regolando diversi processi biologici e sono coinvolti nelle risposte difesa a fitofagi. L’accumulo di PI in seguito a taglio e trattamento con capsiceina potrebbe spiegare l’osservato rallentamento dell’accrescimento delle larve di *Heliothis virescens* (Sels *et al.*, 2008).

6. DISCUSSIONE

Gli insetticidi chimici rappresentano il principale strumento di controllo degli insetti dannosi in agricoltura provocando notevoli rischi per la sicurezza alimentare e la salute umana e determinando seri problemi di sostenibilità economica ed ambientale delle attività relative alla produzione agricola (Slater *et al.*, 2003; Abhilash e Singh, 2009). L'utilizzo di strategie alternative di controllo degli insetti, basate sull'impiego di molecole derivanti da antagonisti naturali, può contribuire significativamente alla riduzione dei rischi ambientali e dei costi della produzione primaria (Sattelle *et al.*, 2008; Horowitz *et al.*, 2009). Le simbiosi antagoniste instaurate dagli Imenotteri parassitoidi con gli insetti rappresentano un'interessante ambito di studio per l'identificazione di geni e molecole naturali efficaci per il controllo degli insetti dannosi (Pennacchio e Strand, 2006). La grande diversità delle strategie sviluppate dal parassitoide fornisce l'opportunità di identificare nuovi geni e molecole coinvolti in molte patologie osservate a carico degli ospiti parassitizzati (Malva *et al.*, 2004; Jervis *et al.*, 2008). I parassitoidi endofagi determinano gravi alterazioni a carico del sistema immunitario, oltre ad alterazioni neuroendocrine e alterazioni dello sviluppo (Webb, 1998; Beckage e Gelman, 2004). Queste patologie sono in gran parte determinate da secrezioni ovariche iniettate dalla femmina nell'ospite al momento dell'ovideposizione (Kroemer e Webb, 2004). Queste secrezioni contengono molecole di differente origine, e possono contenere virus simbiotici della famiglia Polidnaviridae (Drezen *et al.*, 2003; Dupuy *et al.*, 2006). I Polydnavirus sono caratterizzati da un genoma segmentato, costituito da molecole di DNA circolari a doppia elica (Webb *et al.*, 2000; Webb e Strand, 2005). Sono simbionti obbligati stabilmente integrati nel genoma degli endoparassitoidi, dove dopo essersi replicati negli ovari, sono iniettati nel corpo dell'ospite insieme all'uovo (Strand *et al.*, 1992). Una volta infettate, le larve ospiti parassitizzate, esprimono i geni virali i cui prodotti causano le principali alterazioni della fisiologia dell'ospite, in particolare della risposta immunitaria (Beckage e Gelman, 2004; Pennacchio e Strand, 2006). Questi virus rappresentano, pertanto, una valida fonte di geni che codificano per fattori di virulenza naturali con potenziale azione insetticida o che possono alterare in modo profondo la fisiologia degli insetti ospiti.

Nonostante lo studio dei fattori che regolano la fisiologia degli ospiti sia ancora in una fase iniziale, l'uso di molecole derivate dai parassitoidi per lo sviluppo di nuove strategie di protezione delle piante è già stato perseguito, con risultati interessanti (Gill *et al.*, 2006; Maiti *et al.*, 2003). È stato riportato infatti che l'espressione di un gene codificante una proteina secreta da cellule embrionali di un parassitoide, circolanti nell'emolinfa dell'ospite, determina la riduzione dell'accrescimento e maggiore mortalità in larve di *H. virescens* e *Manduca sexta*, alimentate su foglie transgeniche (Maiti *et al.*, 2003).

L'attività di ricerca qui descritta ha avuto lo scopo di studiare il possibile ruolo di un gene isolato da un virus simbiotico dell'Imenottero parassitoide *Toxoneuron nigriceps*, (*TnBV*) nella protezione di piante di tabacco da larve del lepidottero *Heliothis virescens* e del fungo patogeno *Botrytis cinerea*. *TnBVank1* svolge un ruolo essenziale nella parassitizzazione, in quanto codifica una proteina in grado di bloccare la risposta immunitaria degli ospiti parassitizzati, legando irreversibilmente fattori trascrizionali NFkB/REL nel citoplasma (Falabella *et al.*, 2007). Inoltre il gene virale mostra omologia con geni vegetali coinvolti nella regolazione delle risposte di difesa a patogeni fungini (Kuhlmann *et al.*, 2002). Lo studio funzionale di nuove molecole potenzialmente utili per la protezione delle colture dagli stress biotici attraverso le biotecnologie vegetali rappresenta un potente strumento di validazione

della loro attività pesticida (Ferry *et al.*, 2006; Christou *et al.*, 2006). Attraverso le biotecnologie vegetali è infatti possibile produrre in grande quantità e a costo contenuto, il tessuto vegetale trasformato da utilizzare in biosaggi con differenti agenti di stress biotico (Di Maro *et al.*, 2010).

La trasformazione genetica di *Nicotiana tabacum* è stata realizzata utilizzando una cassetta d'espressione, che veicola il prodotto eterologo nel reticolo endoplasmatico. Il motivo lisina- acido aspartico- acido glutammico- leucina (KDEL) è, infatti, comune alle proteine residenti nel reticolo endoplasmico (RE) sia negli animali che nelle piante (Tang *et al.*, 1992) e veicola il riciclo all'RE attraverso il *pathway* cosiddetto retrogrado (Toyooka *et al.*, 2000). La localizzazione nel reticolo endoplasmatico è stata selezionata in quanto studi in letteratura riportano una maggiore stabilità ed un elevato accumulo del prodotto eterologo in pianta, fino a 10-20 volte superiore a quello ottenuto con espressione citosolica (Lopez *et al.* 2010; Petrucelli *et al.*, 2006; Spiegel *et al.*, 1999). L'accumulo stabile della proteina eterologa rappresenta una condizione ideale per la valutazione della sua tossicità mediante biosaggi di resistenza a insetti fitofagi basati sulla somministrazione orale di tessuto transgenico (Maiti *et al.*, 2003; Naimov *et al.*, 2003). Le piante transgeniche prodotte esprimono la proteina stabilmente in quantità monitorabili attraverso i saggi immunologici utilizzati.

Il profilo evidenziato ha mostrato bande di intensità piuttosto variabile tra i diversi eventi di trasformazione. Malgrado l'uso di condizioni fortemente denaturanti, il segnale di ibridazione in western blotting ha mostrato la presenza di multimeri probabile conseguenza di molteplici interazioni della proteina transgenica. Tale ipotesi è compatibile con la struttura di *TnBVANK1*, poiché essa presenta un dominio ankirina molto esteso, noto per essere coinvolto nella mediazione delle interazioni proteina-proteina in diverse famiglie proteiche e presenti in differenti organismi (Sedgwick e Smerdon, 1999; Al-Khodori *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009). È possibile inoltre che la proteina virale venga sumoilata in quanto sono stati individuati, attraverso strumenti bioinformatici, siti di sumoilazione nella sequenza della proteina *TnBVANK1* ovvero di interazione con proteine SUMO (Small Ubiquitin-Related Modifier). La sumoilazione avviene per formazione di legami di natura covalente isopeptidica fra il gruppo carbossiterminale della proteina SUMO e quello amminico di un residuo di lisina specifico della proteina bersaglio (Dohmen, 2004). Le proteine SUMO, di recente caratterizzazione in pianta, sembrano essere coinvolte in diversi processi, fra cui l'aumento della stabilità di alcuni prodotti proteici e sono anche coinvolti nella regolazione delle risposte di difesa (Hoege *et al.*, 2002; van den Burg e Takken, 2010). In particolare è stato riportato che l'interazione di proteine SUMO con IκB può rendere tali inibitori resistenti alla degradazione nel proteasoma, dal momento che il legame con essi avviene sugli stessi residui di lisina usati per l'ubiquitinazione (Matafora *et al.*, 2009; Praefcke *et al.*, 2011). La sumoilazione è normalmente inibita dalla fosforilazione, per cui, l'assenza nella proteina *TnBVANK1* di siti di riconoscimento per le IKK, necessari per l'ubiquitinazione, favorisce l'ipotesi di legame con le proteine SUMO (Desterro *et al.*, 1998). Allo scopo di valutare la localizzazione della proteina ricombinante e caratterizzare ulteriormente i materiali transgenici, sono stati allestiti esperimenti di immunolocalizzazione su protoplasti isolati da foglie transgeniche. Le immagini, acquisite al microscopio confocale, mostrano che la proteina ricombinante è associata alle membrane cellulari. Questa localizzazione è la probabile conseguenza dell'accumulo della proteina nel lume del reticolo ed il suo successivo smistamento nell'apparato del Golgi. La presenza all'estremità C-terminale della proteina transgenica del tetrapeptide segnale per la

ritenzione nel reticolo, determina il riconoscimento della proteina da parte del recettore del KDEL e la sua continua re-immissione nel lume del reticolo (Pagny *et al.*, 1999). E' possibile ipotizzare che l'eccesso di proteina saturi i siti del recettore che non è più in grado di legare la proteina ricombinante. E' noto infatti che l'espressione in pianta di proteine fuse con il tetrapeptide segnale sono solo parzialmente ritenute nel reticolo (Boevink *et al.*, 1996; Gomord *et al.*, 1997). Di conseguenza aliquote di proteina possono rimanere nell'apparato del Golgi ed essere da qui smistate alla membrana plasmatica e ai lisosomi oppure essere secrete. Inoltre poichè le membrane del RE sono continue con la membrana nucleare (Saumonneau *et al.*, 2011), la proteina ricombinante risulta associata ad essa. Tuttavia non è possibile escludere che la proteina di fusione che sfugge al meccanismo di ritenzione nel reticolo, sia veicolata in altri sub-comparti cellulari. E' stato visto che in tabacco, la proteina eterologa sporamina, ancorchè fusa con il tetrapeptide KDEL, si localizza, oltre che nel RE, anche nel vacuolo (Gomord *et al.*, 1997). E' interessante notare che la localizzazione osservata concorda con quanto riportato per alcune proteine del regno vegetale che presentano domini ankirina. La proteina AKR2 di arabidopsis interagisce con alcune proteine esterne della membrana dei cloroplasti, (Bae *et al.*, 2008). Tale interazione è specifica e mediata dai domini ankirina (Bedard e Jarvis, 2008). Similmente la proteina BIANK1 di riso è stata descritta associata alla membrana plasmatica sebbene manchi di domini transmembrana (Zhang *et al.*, 2010).

Allo scopo di verificare gli effetti dell'espressione del *TnBVank1* nelle interazioni pianta-insetto, sono stati realizzati biosaggi di resistenza a *Heliothis virescens*, ospite naturale del *Toxoneuron nigriceps* e fitofago del tabacco, in collaborazione con il Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie vegetali dell'Università della Basilicata. I risultati ottenuti hanno evidenziato che la presenza del prodotto transgenico all'interno dei tessuti vegetali causa un rallentamento significativo nello sviluppo delle larve che si alimentano su di esso. Queste infatti raggiungono il loro massimo incremento ponderale con un ritardo sostanziale rispetto agli insetti controllo. Malgrado l'apparente recupero ponderale successivo, evidenziato al tredicesimo giorno, si può speculare sull'esistenza di una finestra temporale nell'esposizione delle larve al prodotto transgenico, nella quale l'effetto "antimetabolico" esercitato da quest'ultimo, causa un significativo rallentamento dell'accrescimento. Tale rallentamento può essere causato dall'incremento dell'espressione di due geni codificanti per due inibitori di proteasi (PIN1 e KTI, "kunits type inhibitor") osservato in analisi microarray delle linee transgeniche. PIN1 appartiene alla famiglia degli inibitori della chimotripsina (Johnson *et al.*, 1989) e l'espressione in tabacco del gene *Pin1* di patata determina una maggiore resistenza a *Manduca sexta* (Ussuf *et al.*, 2001; Turrà e Lorito, 2011). Anche l'accumulo in piante transgeniche di inibitori appartenenti alla famiglia dei *Kunits type* in particolare *SKTI* (Soybean Kunits trypsin inhibitor) ha mostrato di incrementare la difesa a diversi insetti fitofagi (Lee *et al.*, 1999). La sovraespressione di *PIN1* e *KTI* potrebbe determinare un incremento dei due inibitori con una conseguente riduzione dell'assimilazione di nutrienti da parte delle larve. L'attività antimetabolica degli inibitori di proteasi nei confronti dei fitofagi è già stata ampiamente dimostrata in letteratura (Koiwa *et al.*, 1997; Chen, 2008; Senthilkumar *et al.*, 2010). Gli inibitori di proteasi, tipicamente prodotti in seguito del danno prodotto dall'insetto, si accumulano nei tessuti vegetali e si legano alle proteasi digestive presenti nel suo intestino. La dimostrazione del coinvolgimento degli inibitori di proteasi nelle risposte di difesa è stata ottenuta per la prima volta nel 1972, quando Green e Ryan hanno

mostrato che le ferite causate da *Laptinotarsa decemlineata* (Say) su foglie di piante di pomodoro e di tabacco determinano un aumento sistemico del contenuto di inibitori di tripsina e chimotripsina. L'inibizione dei principali enzimi coinvolti nella digestione degli insetti fitofagi, proteasi e amilasi, riduce sensibilmente l'assimilazione degli aminoacidi essenziali e, quindi, determina il rallentamento dell'accrescimento (Lawrence e Koundal, 2002). Gli inibitori di proteasi sono raggruppati in base alla classe di proteasi (serina, cisteina, metallo o aspartico proteasi) che essi sono in grado di inibire (Terra e Ferreira, 1994). Essi sono ampiamente diffusi nei tessuti vegetali, specialmente nei semi (Zavala *et al.*, 2004). Nelle piante i PI svolgono diverse funzioni fisiologiche come quelle di proteine di riserva, di regolazione dell'attività proteasica endogena, di modulazione dei processi apoptotici, di stabilizzazione delle proteine e di difesa nei confronti di animali, insetti e microrganismi (Rickauer *et al.*, 1989). Nella difesa a fitofagi, l'efficacia dei PI dipende dalla loro affinità e specificità per la proteasi dell'insetto e l'abilità di quest'ultimo di diversificare il proprio arsenale di enzimi digestivi (Kessler e Baldwin, 2002). Geni codificanti per queste proteine sono stati trasferiti ed espressi con successo in pianta, determinando vari livelli di resistenza delle piante trasformate (Johnson *et al.*, 1989; Mc Manus *et al.*, 1994; Yeh *et al.*, 1997). Il primo studio di espressione eterologa di un inibitore di proteasi in tabacco è stato riportato nel 1987, allorché il gene di un inibitore della tripsina di *Vigna unguiculata* (*CpTI*) espresso in tabacco ha incrementato la resistenza della pianta a larve di *H. virescens* (Hilder *et al.*, 1987). Lo stesso gene *CpTI* utilizzato per trasformare diverse piante ospiti ha determinato resistenza nei confronti di vari coleotteri e lepidotteri. L'uso dei geni codificanti inibitori di proteasi nelle piante transgeniche presenta, però, un grosso limite: gli erbivori utilizzano una vasta gamma di enzimi digestivi (Zhu *et al.*, 2005) e in seguito all'inibizione di alcuni di questi, overesprimono gli enzimi che sono insensibili agli inibitori di proteasi (Jongsma e Bolter, 1997; Koiwa *et al.*, 1997). Tuttavia non è possibile escludere che il ritardo di crescita osservato sia la conseguenza di una attività biologica della proteina ricombinante sulla larva di *H. virescens*, simile a quella che si verifica nella larva parassitizzata da *Toxoneuron nigriceps*. È possibile infatti che la proteina ricombinante venga parzialmente traslocata nella cavità emocelica sufficientemente integra per esplicitare una funzione biologica analoga a quella che si osserva nelle larve parassitizzate. Sarà opportuno verificare nelle larve alimentate sulle piante transgeniche la velocità e la consistenza della risposta immunitaria. E' anche ipotizzabile che la struttura della proteina, tale da favorire numerosi e relativamente stabili legami con altre proteine, riduca l'assorbimento di nutrienti o causi danni all'intestino dell'insetto, come riportato per le lectine, che si legano ai carboidrati riducendone la disponibilità per l'alimentazione degli insetti (Michiels *et al.*, 2010).

L'effetto osservato di sviluppo rallentato, piuttosto che la tossicità acuta, possono costituire un'interessante componente del controllo integrato degli insetti dannosi. È stato, infatti, ampiamente documentato in letteratura che una resistenza parziale della pianta associata a ridotto accrescimento del fitofago negli stadi larvali immaturi può risultare nella maggiore efficacia d'azione dei nemici naturali (Boethel e Eikenbary, 1986; Bottrell *et al.*, 1997) e quindi nel maggiore impatto del terzo livello trofico, come confermato anche da esperimenti di laboratorio (Devine *et al.*, 2000). Inoltre, è possibile pensare all'utilizzo di nuove combinazioni geniche per favorire l'assorbimento intestinale, dato che, una delle maggiori limitazioni all'utilizzo di molecole che esplicano la loro tossicità in comparti differenti dall'intestino, è rappresentata proprio dal superamento della barriera gastrica di molecole integre in

grado di raggiungere l'organo bersaglio dell'attività biologica. In tal senso, la membrana peritrofica gioca un importante ruolo (Hegedus *et al.*, 2009). Essa, infatti, rappresenta un “setaccio molecolare” che limita il passaggio di molecole ed il relativo contatto con le cellule dell'epitelio gastrico (Madara, 1997; Futaki *et al.*, 2001). L'alterazione della struttura e della funzione della membrana peritrofica ad opera di enzimi chitinolitici, oltre a procurare *per se* danno all'insetto (Rao *et al.*, 2004; Corrado *et al.*, 2008), favorisce l'assimilazione di molecole tossiche (Fiandra *et al.*, 2010). Le chitinasi sono state utilizzate con successo per incrementare la tossicità della δ -endotossina del *Bacillus thuringiensis*. Larve neonate del lepidottero *Spodoptera littoralis* alimentate con una miscela costituita dalla tossina Bt e da endochitinasi isolata da *Serratia marcescens* hanno mostrato una significativa riduzione del peso (Regev *et al.*, 1996). Uno degli approcci più efficaci finora proposti per incrementare il passaggio di proteine e peptidi attraverso la barriera intestinale dell'insetto è basato sull'uso di una proteina con capacità agglutinanti isolata da *Galantus nivalis* (GNA), una lectina mannosio specifica (Zhang *et al.*, 2010). È stato visto che questa molecola funge da trasportatore transepiteliale di macromolecole nell'intestino medio dei lepidotteri (Michiels *et al.*, 2010). La somministrazione orale di un neuropeptide d'insetto, fuso alla GNA determina una significativa riduzione della crescita degli insetti trattati (Fitches *et al.*, 1997). Recentemente è stato dimostrato che è possibile incrementare l'internalizzazione di proteine di interesse in cellule dell'intestino di *Bombix mori* utilizzando un'altro peptide trasportatore (Cermenati *et al.*, 2011).

Per verificare un'applicazione del gene virale nella difesa a più ampio spettro è stata investigata l'interazione delle piante transgeniche con il patogeno fungino *B. cinerea*. I risultati ottenuti hanno rivelato una maggiore suscettibilità delle piante transgeniche rispetto alle piante controllo. Le prime infatti mostrano aree necrotiche medie, di dimensioni superiori. Questo risultato può essere spiegato sulla base dell'annotazione funzionale e dell'analisi dei *kegg pathway* dei geni risultati sottoespressi nelle piante transgeniche in seguito all'elicitazione delle risposte di difesa. La linea transgenica Sp-ank-kdel 1 ha mostrato la sottoespressione di uno dei geni chiave della biosintesi della lignina (*caffeato-o-metiltrasferasi, comt*) (Guo *et al.*, 2001) e di numerosi altri geni coinvolti nella biosintesi-turnover della parete cellulare (cellulasi, poligalatturonasi, pectinmetilesterasi, proteine ricche di cisteina) (Caffal *et al.*, 2009; Lashbrook e Cai, 2008). Come noto, la parete cellulare può rappresentare un'importante barriera fisica, che protegge le cellule vegetali dall'azione di microrganismi fitopatogeni. Modificazione della parete cellulare, come ad esempio apposizioni di lignina, possono rafforzare tale barriera (Hematy *et al.*, 2009). È stato dimostrato che quest'ultima subisce modificazioni in seguito al tentativo d'attacco dei microrganismi e tra queste modifiche rientra l'apposizione di lignina (Bhuiyan *et al.*, 2009; Denness *et al.*, 2011). Il ruolo della parete risulta determinante nel contenimento degli attacchi di funghi fitopatogeni dotati di meccanismi di penetrazione attiva, tra i quali proprio *B. cinerea* (Asselbergh *et al.*, 2007). La lignificazione ha la potenzialità di agire in diversi modi nella difesa all'infezione dei patogeni. Essa può stabilire una barriera per l'invasione dei patogeni, rende la parete cellulare più resistente agli enzimi degradativi, protegge dalle tossine rilasciate dal patogeno e può favorire la costituzione di strutture atte ad intrappolare il patogeno (Vance *et al.*, 1980; Nicholson e Hammerschmitt, 1992). Le modificazioni della parete cellulare e l'aumento dell'attività degli enzimi coinvolti nella lignificazione sono stati riportati come risposte di difesa all'attacco del fungo *B. cinerea* in grano, in carota e bulbi di narciso (Lloyd *et al.*, 2011).

La lignina si forma dalla polimerizzazione di tre alcool idrocinnamilici, detti anche monolignoli, che sono l'alcool p-cumarilico, l'alcool coniferilico ed l'alcool sinapilico (Vanholme *et al.*, 2010). La biosintesi dei monolignoli parte dal *pathway* dei fenilpropanoidi e quindi dalla deamminazione della fenilalanina e coinvolge successive idrossilazioni dell'anello aromatico seguite da riduzioni e conversioni della catena carbossilica in gruppi alcolici (Lewis e Yamamoto, 1990). L'enzima COMT è responsabile di diverse metilazioni in C3 e C5 dell'anello aromatico dei precursori dei monolignoli, dalla cui polimerizzazione deriva la lignina (Ni *et al.*, 1996; Bhuiyan *et al.*, 2009). In *Medicago sativa* L., ad esempio, il silenziamento del gene *comt* è associato a una diminuzione del contenuto di lignina (Guo *et al.*, 2001). Il ruolo del gene *comt* nella difesa è stato investigato in frumento, dove il silenziamento di questo gene favorisce il processo infettivo di *Blumeria graminis* f.sp.*tritici* (Bhuiyan *et al.*, 2009).

Si ipotizza, quindi, che la maggiore suscettibilità delle piante transgeniche all'infezione sia dovuta ad un'alterazione nella composizione della parete cellulare. Questa ipotesi dovrebbe essere validata mediante l'applicazione di metodiche sperimentali come la spettrometria di massa che consente lo studio della composizione e della struttura della parete cellulare come è stato già riportato in letteratura (Albenne *et al.*, 2011). L'ipotesi di un'alterazione della struttura della parete cellulare è ulteriormente supportata anche dalla sottoespressione di geni coinvolti nel *burst* ossidativo (*cytochrome c-type protein nadh dehydrogenase 18*, *2og-fe oxygenase family protein*). Infatti, una delle prime risposte di difesa in seguito dell'attacco del patogeno è la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nel processo conosciuto come "oxidative burst". Le ROS in primo luogo esplicano la loro funzione tossica nei confronti dell'invasore all'interno dello spazio intercellulare. In secondo luogo, H₂O₂ media la formazione dei legami incrociati tra le glicoproteine di parete, ricche di idrossiprolina, rafforzando la parete cellulare (Hématy *et al.*, 2009). Il ruolo dei ROS nella difesa a *Botrytis cinerea* è stato riportato in letteratura (Asselbergh *et al.*, 2007). In particolare, in mutanti per la sintesi dell'acido abscissico di pomodoro, è stato dimostrato che il rapido accumulo di H₂O₂ nella parete cellulare dell'epidermide può contribuire a bloccare l'infezione di *Botrytis cinerea* (Asselbergh *et al.*, 2007). E' possibile ipotizzare che quindi un minore contenuto di ROS durante il *burst* ossidativo, riduca ulteriormente il rafforzamento della parete cellulare dei tessuti transgenici rispetto al controllo favorendone la diffusione (Mohr e Cahill, 2007). Anche tale ipotesi dovrebbe essere validata tramite approcci di chimica analitica.

Il confronto del pattern d'espressione delle linee transgeniche rispetto al controllo in seguito ad attacco ha evidenziato delle 72 ESTs sottoesprese nella transgenica, ben 47 risultano sovraesprese nelle piante *wild type* a seguito di trattamento con l'elicitore. Tale risultato confermerebbe il ruolo di inibitori delle proteine IκB-like e che, quindi analogamente a quanto si osserva nell'interazione ospite-parassitoide, la proteina *TnBVANK1* inibisce l'attivazione dei geni coinvolti nelle risposte di difesa della pianta e spiega quanto è stato osservato nei saggi biologici fungini. È anche plausibile l'interazione della *TnBVANK1* con fattori NFκB- simili, presenti nelle piante. E' stato infatti dimostrato che la proteina IκB virale interagisce con NFκB eterologhe. Cellule di mammifero HeLa (*Human Cervix Epithelioid Carcinoma*) sono state cotrasfettate con un plasmide contenente il gene reporter luciferasi a valle di 3 siti di legame per NFκB e un vettore contenente una cassetta di espressione con il gene *TnBVANK1*. L'induzione della luciferasi nelle cellule cotrasfettate risulta fortemente dipendente dalla quantità di plasmide contenente *TnBVANK1*, che ad alta dose

riduce sensibilmente l'espressione del gene reporter (Falabella *et al.*, 2007). Allo scopo di approfondire la conoscenza sull'effetto della proteina transgenica in pianta, ad esempio identificandone i possibili *partners* molecolari, sono state condotti ricerche bibliografiche su proteine strutturalmente simili in *Arabidopsis* e tabacco. È, infatti riportata in letteratura in tabacco la proteina *NtANK1*, una I κ B-like che presenta domini ankirina, la cui funzione non è stata ancora definitivamente chiarita. Il gene che codifica per questa proteina è risultato essere sottoespresso a seguito di attacco di patogeni e sembra essere un regolatore negativo di un fattore BZ1-1 coinvolto nella via di trasduzione del segnale dell'auxina e nella risposta a patogeni. In particolare il gene risulta coinvolto nell'attivazione di geni attivi nella risposta ipersensibile (Kuhlmann *et al.*, 2003). *NtANK1* è omologa alla proteina AKR2 di *Arabidopsis thaliana*, anch'essa coinvolta nella difesa. La sottoespressione di AKR2 realizzata con tecniche antisense ha, difatti, determinato un incremento di H₂O₂ e la comparsa di necrosi sulle foglie, associata a una maggiore resistenza a *Pseudomonas syringae* (Yan *et al.*, 2002). La proteina AKR2 è coinvolta nella regolazione del livello di perossido di idrogeno all'interno della cellula vegetale, ottimizzando l'attività di degradazione di tale molecola da parte di una ascorbato perossidasi (APX3) (Shen *et al.*, 2010). È stato dimostrato che AKR2 funge da "chaperone" molecolare legando la proteina APX3 subito dopo la sintesi proteica. In risposta al cambiamento dello stato ossidativo cellulare, AKR2 rilascia APX3 dalle membrane dei perossisomi.

Tali evidenze potrebbero indurre a pensare a un'interferenza del prodotto transgenico con le ascorbato perossidasi APX3, e ad una conseguente alterazione dello stato redox cellulare, data anche l'associazione della proteina virale alle membrane dove l'enzima APX3 svolge la sua attività biologica (Shen *et al.*, 2010). Tale ipotesi potrebbe essere verificata tramite co-immunolocalizzazione della proteina virale e APX3 su protoplasti delle linee transgeniche.

Si potrebbe ipotizzare che il prodotto transgenico sia in grado di sottrarre un NF- κ B Bzi-like al suo corrispondente inibitore *NtANK1*-like, instaurando con esso un legame ad alta affinità, sequestrandolo nel citosol come riportato in precedenza in HeLa cell.

Tale ipotesi necessita di essere verificata tramite approcci di proteomica identificando le interazioni della proteina virale in pianta.

7.CONCLUSIONI

Negli ultimi anni si è registrata una continua crescita degli studi molecolari finalizzati all'isolamento di geni di origine parassitaria a potenziale azione insetticida (Pennacchio *et al.*, 2003).

Il lavoro presentato ha evidenziato, innanzitutto, la compatibilità dei tessuti vegetali con l'espressione del gene *TnBVank1*, candidando la pianta a sistema ideale per la produzione e la possibile purificazione del prodotto transgenico.

Lo studio inoltre ha confermato le potenzialità delle molecole di origine parassitaria nella difesa delle colture e la possibile applicazione nel biocontrollo dei fitofagi, ma allo stesso tempo ne ha sottolineato il limite nella difesa a patogeni fungini.

L'espressione eterologa riportata, inoltre, conferma il ruolo di inibitori dell'attivazione delle risposte di difesa delle proteine I κ B virali e l'identificazione dei partner molecolari di TnBVANK1 potrebbe caratterizzare un NF κ B *pathway* ancora non noto in pianta.

Tale risultato di attività del gene virale in pianta quindi, fornisce una importante ulteriore conferma della conservazione evolutiva di "pathway" di difesa fra due sistemi, quello vegetale e quello animale.

8.BIBLIOGRAFIA

- Abhilash P.C. e Singh N. (2009). Pesticide use and application: An Indian scenario. *J Hazardous Materials*, 165: 1-12
- Albenne C., Canut H., Boudart G., Zhang Y., Clemente H., Pont-Lezica R., Jamet E. (2009). Plant Cell Wall Proteomics: Mass Spectrometry Data, a Trove for Research on Protein Structure/Function Relationships. *Mol Plant*, 2(5): 977-989
- Alfano J.R. e Collmer A. (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol*, 42: 385–414.
- Al-Khodor S., Price C.T., Kalia A., Abu Kwaik Y. (2010). Functional diversity of ankyrin repeats in microbial proteins. *Trends Microbiol*, 18: 132-139
- Asselbergh B., Curvers K., Franca S.C., Audenaert K., Vuylsteke M., Van Breusegem F., Hofte M. (2007). Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiol*, 144: 1863–1877
- Babaeizad V., Imani J., Kogel K.H., Eichmann R., Hüchelhoven R. (2009). Over-expression of the cell death regulator BAX inhibitor-1 in barley confers reduced or enhanced susceptibility to distinct fungal pathogens. *Theor Appl Genet*, 118: 455–463
- Baeuerle P.A. e Henkel T. (1994). Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 12: 141-179
- Beckage N.E. e Gelman D.B. (2004). Wasp parasitoid disruption of host development: implications for new biologically based strategies for insect control. *Annu Rev Entomol*, 49: 299-330
- Bedard J. e Jarvis P. (2008). Green light for chloroplast outer-membrane proteins. *Nat Cell Biol*, 10(2): 120-2
- Beffa R. e Meins F.Jr. (1996). Pathogenesis-related functions of plant beta-1,3 glucanases investigated by antisense transformation--a review. *Gene*, 179(1): 97-103
- Beg A.A., Ruben S.M., Scheinman R. I., Haskill S., Rosen C. A., Baldwin A.Jr (1992). I κ B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of Nf- κ B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes dev*, 6: 1899- 1913
- Bellafiore S., Shen Z.X., Rosso M.N., Abad P., Shih P., Briggs S.P. (2008). Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. *PLoS Pathog*, 4, p. e1000192
- Bertini L., Cascone A., Tucci M., D'Amore R., Di Berardino I., Buonocore V., Caporale C., Caruso C. (2006). Molecular and functional analysis of new members of the wheat PR4 gene family. *Biol Chem*, 387(8): 1101-11
- Bhuiyan N.H., Selvaraj G., Wei Y., King J. (2009). Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. *J Exp Bot*, 60 (2): 509-521
- Boethel D.J. e Eikenbary R.D. (1986). Interactions of plant resistance and parasitoid and predators of insects. Ellis Horwood Ltd, Chichester, England

- Boevink P., Santa Cruz S., Hawes C., Harris N. and Oparka, K. (1996). Virus-mediated delivery of the green fluorescent protein to the endoplasmic reticulum of plant cells. *Plant J*, 10: 935–941
- Bolton M.D. (2009). Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. *Mol Plant Microbe Interact*, 22: 487–497
- Bonnet P., Bourdon E., Ponchet M., Blein J-P., Ricci P. (1996). Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *Eur J Plant Pathol*, 102: 181–192
- Bork P. (1993). Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally? *Proteins Struct Funct Genet*, 17: 363–374
- Bos J.I., Armstrong M.R., Gilroy E.M., Boevink P.C., Hein I., Taylor R.M., Zhendong T., Engelhardt S., Vetukuri R.R., Harrower B., Dixelius C., Bryan G., Sadanandom A., Whisson S.C., Kamoun S., Birch P.R. (2010). *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG. *Proc Natl Acad Sci*: 107, 9909–9914
- Böttner S., Iven T., Carsjens C.S. and Dröge-Laser, W. (2009). Nuclear accumulation of the ankyrin repeat protein ANK1 enhances the auxin-mediated transcription accomplished by the bZIP transcription factors BZI-1 and BZI-2. *Plant J*, 58: 914–926
- Bottrell D.G., Barbosa P., Gould F. (1997). Manipulating natural enemies by plant variety selection and modification: a realistic strategy? *Annu Rev Entomol*, 43: 347–67
- Bourque S., Ponchet M., Binet M.N., Ricci P., Pugin A., Lebrun-Garcia A. (1998). Comparison of binding properties and early biological effects of elicitors in tobacco cells. *Plant Physiol*, 118: 1317–1326
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248–254
- Caffall K.H. e Mohnen D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr Res*, 344(14): 1879–900
- Cao H., Li X., Dong X. (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11): 6531–6
- Cermenati G., Terracciano I., Castelli I., Giordana B., Rao R., Pennacchio F., Casartelli M. (2011). The CPP Tat enhances eGFP cell internalization and transepithelial transport by the larval midgut of *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae). *J Insect Physiol*, 57(12):1689–97
- Chen M.-S. (2008). Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science*, 15: 101–114
- Chen M.-S., Fitzgerald H.A., Yadav R.C., Canlas P.E., Dong X., Ronald P.C. (2001). Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signalling pathway in Arabidopsis. *Plant J*, 27: 101–113
- Chen M., Fitzgerald H.A., Canlas P.E., Navarre D.A., Ronald P.C. (2005). Overexpression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. *Mol Plant Microbe Interact*, 18(6): 511–20

- Chiao P.J., Miyamoto S., Verma I.M. (1994). Autoregulation of I κ B α activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:28-32
- Chinchilla D., Bauer Z., Regenass M., Boller T., and Felix G. (2006). The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell*, 18: 1-12
- Chisholm S.T., Coaker G., Day B., Staskawicz B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124: 803–814
- Christou P., Capell T., Kohli A., Gatehouse J.A., Gatehouse A.M.R. (2006). Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *Trends Plant Sci*, 11: 302-308
- Colcombet J. e Hirt H. (2008). *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem J*, 413: 217–226
- Corrado G., Arciello S., Fanti P., Fiandra L., Garonna A., Digilio M.C., Lorito M., Giordana B., Pennacchio F., Rao R. (2008). The Chitinase A from the baculovirus AcMNPV enhances resistance to both fungi and herbivorous pests in tobacco. *Transgenic Res*, 17(4): 557-71
- Cunnac S., Lindeberg M., Collmer A. (2009). *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Curr Opin in Microb*, 12: 53-60
- Day B., Dahlbeck D., Staskawicz B.J. (2006). NDR1 interaction with RIN4 mediates the differential activation of multiple disease resistance pathways. *Plant Cell*, 18: 2782-2791
- De Lorenzo G., D'Ovidio R., Cervone F. (2001). The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol*, 39: 313–335
- Delaney T.P (2000). New mutants provide clues into regulation of systemic acquired resistance. *Trends Plant Sci*, 5(2): 49-51
- Delledonne M. (2005). NO news is good news for plants. *Curr Opin Plant Biol*, 8: 390–396
- Denness L., McKenna J.F., Segonzac C., Wormit A., Madhou P., Bennett M., Mansfield J., Zipfel C., Hamann T. (2011). Cell wall damage-induced lignin biosynthesis is regulated by a reactive oxygen species- and jasmonic acid-dependent process in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 156(3): 1364-74
- Desterro J.M., Rodriguez M.S., Hay R.T. (1998). SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation. *Mol Cell*, 2(2): 233-9
- Devine G.J., Wright D.J., Denholm I. (2000). A parasitic wasp (*Eretmocerus mundus* Mercet) can exploit chemically induced delays in the development rates of its whitefly host (*Bemisia tabaci* Genn.). *Biological Control*, 19: 64–75
- DeYoung B.J., Innes R.W. (2006). NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nat Immunol*, 7 (12): 1243-1249
- Di Maro A., Terracciano I., Sticco L., Fiandra L., Ruocco M., Corrado G., Parente A., Rao R. (2010). Purification and characterization of a viral chitinase active against plant pathogens and herbivores from transgenic tobacco. *J Biotechnol*, 147: 1-6

- Dixon D.C., Cutt J.R., Klessig D.F. (1991). Differential targeting of the tobacco PR-1 pathogenesis-related proteins to the extracellular space and vacuoles of crystal idioblasts. *EMBO J*, 10: 1317-1324
- Dodds P.N., Lawrence G.J., Ellis J.G. (2001). Contrasting modes of evolution acting on the complex *N* locus for rust resistance in flax. *Plant J*, 27: 439–453
- Dohmen R.J. (2004). SUMO protein modification. *Biochim Biophys Acta*, 1695: 113-131
- Drezen J.-M., Provost B., Espagne E., Cattolico L., Dupuy C., Poirie M., Periquet G., Huguet E. (2003). Polydnavirus genome: integrated vs. free virus. *J Insect Physiol*: 49: 407-417
- Dupuy C., Huguet E., Drezen J.-M. (2006). Unfolding the evolutionary story of polydnaviruses. *Virus Res*, 117: 81-89
- Engstrom Y. (1999). Induction and regulation of antimicrobial peptides in *Drosophila*. *Dev Comp Immunol*, 23: 345-358
- Falabella P., Varricchio P., Provost B., Espagne E., Ferrarese R., Grimaldi A., De Eguileor M., Fiminai G., Urini M.V., Malva C., Drezen J.M, Pennacchio F. (2007). Bracoviruses contain a multigene family coding for I κ B-like proteins. *J Gen Virol*: 88, 92-104
- Felix G. e Boller T. Molecular sensing of bacteria in plants (2003). The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J Biol Chem*, 278: 6201–6208
- Ferry N., Edwards M.G., Gatehouse J., Capell T., Christou P., Gatehouse A.M.R. (2008). Transgenic Plants for Insect Pest Control: A Forward Looking Scientific Perspective. *Transgenic res*, 15: 13-19
- Feys B.J., Moisan L.J., Newman M.A., Parker J.E . (2001). Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *EMBO J*, 20: 5400–5411
- Fiandra L., Terracciano I., Fanti P., Garonna A., Ferracane L., Fogliano V., Casartelli M., Giordana B., Rao R., Pennacchio F. (2010). A viral chitinase enhances oral activity of TMOF. *Insect Biochem Mol Biol*, 40(7): 533-40
- Fitches E., Gatehouse A.M.R., Gatehouse J.A. (1997). Effects of snowdrop lectin (GNA) delivered via artificial diet and transgenic plants on the development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae in laboratory and glasshouse trials. *J Insect Physiol*, 43: 727–39
- Fitzgerald H.A., Chern M.-S., Navarre R., Ronald P. C. (2004). Overexpression of (At)NPR1 in Rice leads to BTH-and Environment-Induced Lesion-mimic/Cell Death Phenotype. *Mol Plant-Microbe Interact*, 17(2): 140-151
- Flor H. H. (1955). Host-parasite interaction in flax rust. Its genetics and other implication. *Phytopathology*, 45: 680-685
- Friedrich L., Lawton K., Dietrich R., Willits M., Cade R., Ryals J. (2001). *NIM1* overexpression in Arabidopsis potentiates plant disease resistance and results in enhanced effectiveness of fungicides. *Mol Plant-Microbe Interact*, 14:1114–1124

- Fritig B. e Hirth L. (1971). Biosynthesis of phenylpropanoids and coumarins in TMV-infected tobacco leaves and tobacco cultures. *Acta Phytopathologica*, 6: 21–29
- Futaki S., Suzuki T., Ohashi W., Yagami T., Tanaka S., Ueda K. Sugiura Y. (2001). Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem*, 8: 5836-40
- Gehrig A., Schu"ßler A., Kluge M. (1996). *Geosiphon pyriforme*, a fungus forming endocytobiosis with *Nostoc* (Cyanobacteria) is an ancestral member of the Glomales: Evidence by SSU rRNA analysis. *J Mol Evol*, 43: 71–81
- Ghosh S. e Karin M. (2002). Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell*, 109: S81-S96
- Ghosh S., May M.J., Kopp E.B. (1998). NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 16: 225-60
- Gill T.A., Fath-Goodin A., Maiti I.I., Webb B.A. (2006). Potential uses of Cys-motif and other polydnavirus genes in biotechnology. *Adv Virus Res*, 68: 393-426
- Girardin S.E., Boneca I.G., Carneiro L.A., Antignac A., Jéhanho M., Viala J., Tedin K., Taha M.-K., Labigne A., Zaehring U., Coyl A.J., Di Stefano P.S., Bertin J., Sansonetti P.J., Philpott D.J. (2003) Nod1 Detects a Unique Muropeptide from Gram-Negative Bacterial Peptidoglycan. *Science*, 300: 1584–1587
- Gomez-Ariza J., Campo S., Rufat M., Estopa M., Messeguer J., San Segundo B., Coca M. (2007). Sucrose-mediated priming of plant defense responses and broad-spectrum disease resistance by overexpression of the maize pathogenesis-related PRms protein in rice plants. *Mol Plant Microbe Interact*, 20: 832–842
- Gómez-Gómez L. e Boller T., (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell*, 5: 1003–1011
- Gomord V., Denmat L.A., Fitchette-Lainé A.C., Satiat-Jeunemaitre B., Hawes C., Faye L. (1997). The C-terminal HDEL sequence is sufficient for retention of secretory proteins in the endoplasmic reticulum (ER) but promotes vacuolar targeting of proteins that escape the ER. *Plant J*, 11(2): 313-25
- González-Lamothe R. , Mitchell G., Gattuso M., Moussa S., Malouin D.F., Bouarab K. (2009). Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *Int J Mol Sci*, 10(8): 3400-3419
- Green R.T., Ryan C.A. (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science*, 175: 776-777
- Grimm S. e Baeuerle P.A. (1993). The inducible transcription factor NF-B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem J*, 290: 297-308
- Guilley H., Dudley R. K., Jonard G., Balazs E., Richards K. B. (1982). Transcription of cauliflower mosaic virus DNA; detection of promoter sequences and characterization of transcripts. *Cell*, 30:763-773
- Guo D., Chen F., Inoue K., Blount J.W., Dixon R.A. (2001). Downregulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase in transgenic alfalfa. impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. *Plant Cell*, 13(1): 73-88
- Gust A, Brunner F., Nürnberg T. (2010). Biotechnological concepts for improving plant innate immunity. *Curr Opin Biotech*, 21(2): 204-210

- Gust A., Brunner F., Nürnberger T. (2010). Biotechnological concepts for improving plant innate immunity. *Curr Opin in Biot*, 21 (2): 204-21
- Hain R., Reif H.J., Krause E., Langebartels R., Kindl H., Vornam B., Wiese W., Schmelzer E., Schreier P.H., Stocker R.H., *et al.* (1993). Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature*, 361: 153–156
- Hammond-Kosack K.E. and Jones J.D. (1996). Resistance gene dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 8(10): 1773–1791
- Hauck P., Thilmony R., He S.Y. (2003). A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible Arabidopsis plants. *Proc Natl Acad Sci*, 100: 8577-8582
- Hayashi F., Smith K.D., Ozinsky A., Hawn T.R., Yi E.C., Goodlett D.R., Eng J.K., Akira S., Underhill D.M., Aderem A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410: 1099-1103
- Heese A., Hann D.R., Gimenez-Ibanez S., Jones A.M.E., He K., Li J., Schroeder J.I., Peck S.C, Rathjen J. P. (2007). The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (29): 12217-12222
- Hegedus D., Erlandson M., Gillott C., Toprak U. (2009). New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu Rev Entomol*, 54: 285-302
- Heitz T., Geoffroy P., Stintzi A., Fritig B. Legrandf M. (1993). cDNA Cloning and Gene Expression Analysis of the Microbial Proteinase Inhibitor of Tobacco. *J Biol Chem*, 268: 16987-16992
- Hématy K., Cherk C., Somerville S. (2009). Host–pathogen warfare at the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol*, 12: 406-413
- Hilder V.A., Gatehouse A.M.R., Sheerman S.F., Barker R.F., Boulder D. (1987). A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*: 330, 160-163
- Hoege C., Pfander B., Moldovan G.L., Pyrowolakis G., Jentsch S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, 419: 135–41
- Hoffmann J. A. (2003). The immune response of *Drosophila*. *Nature*, 426: 33-38
- Hoffmann J.A. e Reichhart J.M. (2002). *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature Immunol*, 3: 121-126.
- Horowitz A.R., Ellsworth P.C., Ishaaya I. (2009). Genetically Modified Insects as a Tool for Biorational Control. *Biorational control of arthropod pests*: 1-20
- Howe G.A. e Jander G. (2008). Plant Immunity to Insect Herbivores. *Annu Rev Plant Biol*, 59: 41–46
- Huang J., Zhao X., Yu H., Ouyang Y., Wang L., Zhang Q. (2009). The ankyrin repeat gene family in rice: genome-wide identification, classification and expression profiling. *Plant Mol Biol*, 71(3): 207-26
- Hulbert S.H., Webb C.A., Smith S.M., Sun Q. (2001). Resistance gene complexes: Evolution and Utilization. *Annu Rev Phytopathol*, 39: 285–312
- Inohara N., Chamaillard M., McDonald C., Nunez G. (2005). NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem*, 74:

Jervis M.A., Ellers J., Harvey J.A. (2008). Resource acquisition, allocation, and utilization in parasitoid reproductive strategies. *Annu Rev Entomol*, 53: 361-85

Jia Y., McAdams S.A., Bryan G.T., Hershey H.P., Valent B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J*, 19: 4004-4014

Johnson R., Narvaez J., An G., Ryan C. (1989). Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: Effects on natural defense against *Munduca sexta* larvae. *Proc Nat Acad Sci USA*, 86: 9871-9875

Johnson E.S. (2004) Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem*, 73: 355-82

Jones J.D, Dangl J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444: 323-9

Jongsma M.A., Bolter C. (1997). The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J Insect Physiol*: 43, 885-895

Kaminaka H., Nake C., Epple P., Dittgen J., Schutze K., Chaban C., Holt III B.F., Merkle T., Schafer E., Harter K., Dangl J.L. (2006). bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in Arabidopsis following infection. *EMBO J*, 25: 4400–441

Kamoun S. (2007). Groovy times: Filamentous pathogen effectors revealed. *Curr Opin Plant Biol*, 10: 358-365

Kang S., Dobinson K.F. (2004). Molecular and genetic basis of plant-fungal pathogen interactions. *Applied Mycology and Biotechnology*, 4: 59-97

Karin M. e Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NFkB activity. *Annu Rev Immunol*, 18: 621–663

Kessler A. e Baldwin I.T. (2002). Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu Rev Plant Biol*, 53: 299-328

Knepper C., Savory E.A., Day B. (2011). Arabidopsis NDR1 is an integrin-like protein with a role in fluid loss and plasma membrane-cell wall Adhesion. *Plant Physiol*, 156: 286-300

Kobayashi M., Ohura I., Kawakita K., Yokota N., Fujiwara M., Shimamoto K., Doke N., Yoshioka H. (2007). Calcium-Dependent Protein Kinases Regulate the Production of Reactive Oxygen Species by Potato NADPH Oxidase. *Plant Cell*, 19(3): 1065–1080

Koiwa H., Bressan R.A., Hasegawa P.M. (1997). Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends Plant Sci*, 2(10): 379-384

Kovtun Y., Chiu W.L., Tena G., Sheen J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 2940–2945

Kroemer J.A. e Webb B.A. (2004). Polydnavirus genes and genomes: Emerging Gene Families and New Insights into Polydnavirus Replication. *Annu Rev Entomol*, 49: 431-56

Kuhlmann M., Horvay K., Strathmann A., Heinekamp T., Fischer U., Böttner S., Dröge-Laser W. (2003). The α -Helical D1 Domain of the tobacco bZIP transcription factor BZI-1 interacts with the ankyrin-repeat protein ANK1 and is important for BZI-1

function, both in auxin signaling and pathogen response. *J Biol Chem*, 278(10): 8786-94

Kumagai F., Hasezawa S., Yohsuke T., Nagata T. (1995). The involvement of protein synthesis elongation factor 1 α in the organization of microtubules in the perinuclear region during the cell cycle transition from M phase to G1 phase in tobacco BY-2 cells. *Bot Acta*, 108: 467-473

Kurepa J., Walker J.M., Smalle J., Gosink M.M., Davis S.J., Durham T.L., Sung D.Y., Vierstra R.D.J. (2003). The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in Arabidopsis. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. *Biol Chem*, 278(9): 6862-72

Kvitko B.H., Park D.H., Velasquez A.C., Wei C., Russell A.B., Martin G.B., Schneider D.J., Collmer A. (2009). Deletions in the Repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Type III Secretion Effector Genes Reveal Functional Overlap among Effectors. *PLoS Pathog* 5(4): e1000388

Lashbrook C., Cai S. (2008). Cell wall remodeling in Arabidopsis stamen abscission zones: Temporal aspects of control inferred from transcriptional profiling. *Plant Signal Behav*, 3(9): 733–736

Lawrence P. K. e Koundal K. R. (2002). Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electron J Biotechnol*, 5(1): 93-103

Lecourieux D., Ranjeva R., Pugin A. (2006). Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol*, 171: 249–269

Lee S., Lee S-H, Choon Koo J., Jin Chun H., Lim C.O., Hee Mun J., Han Song Y., Je Cho M. (1999). Soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI) confers resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) in transgenic rice. *Molecular Breeding*, 5: 1-9

Lewis N.G., Yamamoto E. (1990). Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 41: 455-96

Li D., Wang L., Wang M., Xu Y.Y., Luo W., Liu Y.J., Xu Z.H., Li J., Chong K. (2009). Engineering *OsBAK1* gene as a molecular tool to improve rice architecture for high yield. *Plant Biotechnol J*, 7: 791–806

Liu Y., Schiff M., Marathe R. and Dinesh-Kumar, S.P. (2002). Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for *N*-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J*, 30: 415–429

Livak K.L. e Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. *Methods*, 25: 402-408

Lloyd A.J., Allwood J., Winder C.L., Dunn W.B., Heald J.K., Cristescu S.M., Sivakumaran A., Harren F.J.M., Mulema J., Denby K., Goodacre R., Smith A.R. Mur L.A.J.(2011). Metabolomic approaches reveal that cell wall modifications play a major role in ethylene-mediated resistance against *Botrytis cinerea*. *Plant J*, 67: 852–868

Lopez J., Lencina F., Petruccelli S., Marconi P., Alvarez M. A. (2010). Influence of the KDEL signal, DMSO and mannitol on the production of the recombinant antibody 14D9 by long-term *Nicotiana tabacum* cell suspension culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 103: 307-314

Mackey D. e McFall A. J. (2006). MAMPs and MIMPs: proposed classifications for

inducers of innate immunity. *Mol Microbiol*, 61: 1365–1371

Mackey D., Belkhadir Y., Alonso J.M., Ecker J.R., Dangl J.L. (2003). Arabidopsis RIN4 Is a Target of the Type III Virulence Effector AvrRpt2 and Modulates RPS2-Mediated Resistance. *Cell*, 112 (3): 379-389

Madara J.L. (1997). Pathobiology of neutrophil interactions with intestinal epithelia. *Aliment Pharmacol Ther Suppl*, 3: 57-62

Maiti I.B., Dey N., Pattanaik S., Dalhamn D.L., Rana R.L., Webb B.A. (2003). Antibiosis-type insect resistance in transgenic plants expressing a teratocyte secretory protein TSP14 gene from a hymenopterous endoparasite. *Plant Biotech J*, 1: 209-219

Makandar R., Essig J.S., Schapaugh M.A., Trick H.N., Shah J. (2006). Genetically engineered resistance to Fusarium head blight in wheat by expression of *Arabidopsis* *NPR1*. *Mol Plant Microbe Interact*, 19:123–129

Maleck K., Lawton K. (1998). Plant strategies for resistance to pathogens. *Curr Opin Biotechnol*, 9 (2): 208-213

Malva C., Varricchio P., Falabella P., La Scaleia R., Graziani F., Pennacchio F. (2004). Physiological and molecular interaction in the host-parasitoid system *Heliothis virescens*-*Toxoneuron nigriceps*: current status and future perspectives. *Insect Biochem Mol Biol*, 34(2): 177-83

Martin G.B., Bogdanove A.J., Sessa G. (2003). Understanding the functions of functions of plant disease resistance proteins. *Annu Rev Plant Biol*, 54: 23-61

Matafora V., D'Amato A., Mori S., Blasi F. Bachi A. (2009). Proteomics analysis of nucleolar SUMO-1 target proteins upon proteasome inhibition. *Mol Cell Proteomics*, 8: 2243-2255

McManus M.T., Laing W.A., Christeller J.T. (1994). Wounding induces a series of closely related trypsin/chymotrypsin inhibitory peptides in leaves of tobacco. *Phytochemistry*, 37(4): 921-6

Medzhitov R. e Charles J. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin in Immun*, 9 (1): 4-9

Mestre P., Baulcombe D.C. (2006). Elicitor-mediated oligomerization of the tobacco *N* disease resistance protein. *Plant Cell*: 18, 491–501

Michaely P., Bennett V. (1995). The ANK repeats of erythrocyte ankyrin form two distinct but cooperative binding sites for the erythrocyte anion exchanger. *J Biol Chem*, 270(37): 22050-7

Michiels K., Van Damme E.J., Smagghe G. (2010). Plant-insect interactions: what can we learn from plant lectins? *Arch Insect Biochem Physiol*, 73(4):193-212

Moeder W., Del Pozo O., Navarre D.A., Martin G.B., Klessig D.F. (2007). Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Mol Biol*, 63(2): 273-87

Mohr P.G. and Cahill D. M. (2007). Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*. *Funct Integr Genomics*, 7(3): 181-191

Møller I.M., Jensen P.E., Hansson A. (2007). Oxidative modifications to cellular

components in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 58: 459-481

Moore J.W., Loake G.J., Spoel S.H. (2011). Transcription Dynamics in Plant Immunity. *Plant Cell*, 23: 2809-2820

Mosolov V.V. e Valueva T.A. (2008). Proteinase Inhibitors in Plant Biotechnology: A Review. *Appl Biochim Microbiol*, 44: 233–240

Mueller M.J. (2004). Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Curr Opin Plant Biology*, 7(4): 441-448

Naimov S., Dukiandjiev S., De Maagd R.A. (2003). A hybrid *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin gives resistance against a coleopteran and a lepidopteran pest in transgenic potato. *Plant Biotech J*, 1: 51–57

Ni W., Sewalt V., Korth K.L., Blount J.W., Ballance G.M., Dixon R.A. (1996). Stress Responses in Alfalfa Activation of Caffeic Acid 3-O-Methyltransferase and Caffeoyl Coenzyme A 3-O-Methyltransferase Genes Does Not Contribute to Changes in Metabolite Accumulation in Elicitor-Treated Cell-Suspension Cultures. *Plant Physiol*, 112(2): 717-726

Nicholson R.L., Hammerschmidt R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu Rev Phytopathol*: 30, 369–389

Niggeweg R., Thurow C., Weigel R., Pfitzner U., Gatz C. (2000). Tobacco TGA factors differ with respect to interaction with NPR1, activation potential and DNA-binding properties. *Plant Mol Biol*, 42: 775–788

Nürnberg T. Brunner F. Kemmerling B., Piater L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immun Rev*, 198: 249-266

Pagny S., Lerouge P., Faye L., Gomond V. (1999). Signals and mechanisms for protein retention in the endoplasmic reticulum. *J of Exp Bot*, 50 (331): 157-164

Palek J. e Lambert S. (1990). Genetics of the red cell membrane skeleton. *Semin Hematol*, 27: 290-332

Park S.-W., Kaimoyo E., Kumar D., Mosher S., Klessig, D.F. (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, 318: 113–116

Park S.-W., Liu P.-P, Forouhar F., Vlot A.C., Tong L., Tietjen K., Klessig D.F. (2009). Use of a synthetic salicylic acid analog to investigate the roles of methyl salicylate and its esterases in plant disease resistance. *J Biol Chem*, 284: 7307–7317.

Pennacchio F. e Strand M.R. (2006). Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annu Rev Entomol*, 51: 233-58

Pennacchio F., Vinson S.B., Tremblay E. (1993). Growth and development of *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera, Braconidae) larvae and their synchronization with some changes of the hemolymph composition of their host, *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera, Noctuidae). *Arch Insect Biochem Physiol*, 24: 65–77

Petrucelli S., Otegui M.S., Lareu F., Tran Dinh O., Fitchette A.C., Circosta A., Rumbo M., Bardor M., Carcamo R., Gomord V., Beachy R.N. (2006). A KDEL-tagged monoclonal antibody is efficiently retained in the endoplasmic reticulum in leaves, but is both partially secreted and sorted to protein storage vacuoles in seeds.

Plant Biotechnol J, (5): 511-27

Pieterse C.M.J., Van Loon L.C. (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol*, 7(4): 456-464.

Pitzschke A., Schikora A., Hirt H. (2009). MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Curr Opin Plant Biol*, 12 (4): 421-426

Pourcel L., Routaboul J-M., Cheynier V., Lepiniec L., Debeaujon I., (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends Plant Sci*, 12: 29-36

Praefcke G.J.K., Hofmann K., Dohmen R.J. (2011). SUMO playing tag with ubiquitin. *Trends Biochem Sci*, in press

Quaglia M., Ederli L., Pasqualini S., Zizzerini A. (2011). Biological control agents and chemical inducers of resistance for postharvest control of *Penicillium expansum* Link. on apple fruit. *Postharvest Biol Technol*, 59 (3): 307-315

Rao R., Fiandra L., Giordana B., de Eguileor M., Congiu T., Burlini N., Arciello S., Corrado G., Pennacchio F. (2004). AcMNPV ChiA protein disrupts the peritrophic membrane and alters midgut physiology of *Bombyx mori* larvae. *Insect Biochem Mol Biol*, 34(11): 1205-13

Regev A., Keller M., Strizhov N., Sneh B., Prudovsky E., Chet I., Ginzberg I., Konez C., Schell J., Zilberstein A. (1996). Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Appl Environ Microbiol*, 62: 3581-86

Ren D., Liu Y., Yang K.-Y., Han L., Mao G., Glazebrook J., Zhang S. (2008). A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 5638-5643

Resterucci V., Stallaert M.L., Milat A., Pugin P., Ricci J.P. Blein. (1996). Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiol*, 111: 885–891

Rickauer M., Fournier, J., Esquerré-Tugayé, M.T. (1989). Induction of proteinase inhibitors in tobacco cell suspension culture by elicitors of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Plant Physiol*, 90: 1065-1070

Ronald P.C. and Adamchak R.W. (2008). *Tomorrow's Table Organic Farming, Genetics, and the Future of Food*. Oxford University Press, New York

Sachdev S.A., Hoffmann A., Hannink M. (1998). Nuclear localization of I κ B α is mediated by the second ankyrin repeat: the I κ B α ankyrin repeats define a novel class of *cis*-acting nuclear import sequences. *Mol Cell Biol*, 18: 2524-34

Sattelle D.B., Cordova D. (2008). Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. *Invert Neurosci*, 8:107–11

Saumonneau A., Rottier K., Conrad U., Popineau Y., Guéguen J., Francin-Allami M. (2011). Expression of a new chimeric protein with a highly repeated sequence in tobacco cells. *Plant Cell Rep*, 30: 1289-1302

Schulze B., Mentzel T., Jehle A.K., Mueller K., Beeler S., Boller T., Felix G., Chinchilla D. (2010). Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *J Biol Chem*, 285:

Sedgwick S.G. and Smerdon S.J. (1999). The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci*, 24: 311–16

Sedgwick S.G. e Smerdon S.J. (1999). The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci*, 24: 311–16

Sels J., Mathys J., De Coninck B.M.A., Cammue B.P.A., De Bolle M.F.C. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiol Biochem*, 46: 941–950

Sendon P.M., Seo H.S., Song J.T. (2011). Salicylic Acid Signaling: Biosynthesis, Metabolism, and Crosstalk with Jasmonic Acid. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 54(4): 501-506

Senthilkumar R., Cheng C.P., Yeh K.W. (2010). Genetically pyramiding protease-inhibitor genes for dual broad-spectrum resistance against insect and phytopathogens in transgenic tobacco. *Plant Biotechnol J*, 8(1): 65-75

Shah J. (2009). Plants under attack: systemic signals in defence. *Curr Opin Plant Biol*, 12(4): 459-464

Shen G., Kuppu S., Venkataramani S., Wang J., Yan J., Qiu X., et al. (2010). The Arabidopsis ankyrin repeat-containing protein 2A is an essential molecular chaperone for peroxisomal membrane-bound ascorbate peroxidase 3 in Arabidopsis. *Plant Cell*, 22: 811–831

Shin S., Mackintosh C.A., Lewis J., Heinen S.J., Radmer L., Dill-Macky R., Baldridge G.D., Zeyen R.J., Muehlbauer G.J. (2008). Transgenic wheat expressing a barley class II chitinase gene has enhanced resistance against *Fusarium graminearum*. *J Exp Bot*, 59: 2371–2378

Shirasu K. e Schulze-Lefert P. (2003). Complex formation, promiscuity and multi-functionality: protein interactions in disease-resistance pathways. *Trends Plant Sci*, 8 (6): 252-258

Slater A., Scott N., Fowler M. (2003). *Plant Biotechnology*. Oxford University Press

Spiegel H., Schillberg S., Sack M., Holzem A., Nähring J., Monecke M., Liao Y.-C., Fischer R. (1999). Accumulation of antibody fusion proteins in the cytoplasm and ER of plant cells. *Plant Science*, 149: 63-71

Strand M.R., McKenzie D.I., Grassl V., Dover B.A., Aiken J.M. (1992). Persistence and expression of *Microplectis demolitor* polydnavirus in *Pseudoplusia includens*. *J Gen Virol*: 73, 1627–1635

Strompen G., Gruner R., Pfitzner U.M. (1998). An as-1-like motif controls the level of expression of the gene for the pathogenesis- related protein 1a from tobacco. *Plant Mol Biol*, 37: 871– 883

Stuiver M.H. and Custers J.H.H.V. (2001). Engineering disease resistance in plants. *Nature*, 411: 865–868

Sun S.C., Ganchi P.A., Ballard D.W., Greene W.C. (1993). NF-kB controls expression of inhibitor IkBa: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science*, 259: 1912-15

Tamai A. e Meshi T. (2001). Cell-to-cell movement of Potato virus X: The role of p12

and p8 encoded by the second and third open reading frames of the triple gene block. *Mol Plant-Microbe Interact*, 14: 1158- 1167

Tang B.L., Wong S.H., Low S.H., Hong W. (1992). Retention of a type II surface membrane protein in the endoplasmic reticulum by the Lys-Asp-Glu-Leu sequence. *J Biol Chem*, 267(10): 7072-6

Terra W.R. and Ferreira C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Biochem Physiol*, 109: 1–62

Thatcher L.F., Anderson J.P., Singh K.B. (2005). Plant defence responses: what have we learnt from *Arabidopsis*? *Functional Plant Biology*, 32: 1–19

Thoetkiattikul H., Beck M.H., Strand M.R. (2005). Inhibitor I κ B-like proteins from a polydnavirus inhibit NF- κ B activation and suppress the insect immune response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 11426-31

Thomzik J., Stenzel K., Stöcker R., Schreier P., Hain R., Stahl D.J. (1997). Synthesis of grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 51: 265–278

Torres M.A., Jones J.D.G., Dangl J.L. (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol*, 141: 373-378

Toyooka K., Okamoto T., Minamikawa T. (2000). Mass transport of Proform of a KDEL-tailed cysteine proteinase (SH-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds. *J Cell Biol*, 148: 453-464

Turpin P., Hay R.T., Dargemont C. (1999). Characterization of I κ B α nuclear import pathway. *J Biol Chem*, 274: 6804-12

Turrà D. e Lorito M. (2011). Potato type I and II proteinase inhibitors: modulating plant physiology and host resistance. *Curr Protein Pept Sci*, 12(5):374-85

Ussuf K.K., Laxmi N.H., Mitra R. (2001). Proteinase inhibitors: Plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. *Current Science*, 80(7): 847-853

van den Burg H. A., Takken F.L.W. (2010). SUMO-, MAPK- and resistance protein-signaling converge at transcription complexes that regulate plant innate immunity. *Plant Signal Behav*, 5(12): 1597–1601

van der Hoorn R.A.L. e Kamoun S. (2008). From guard to decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell*, 20: 2009-2017

Van Loon L. e Van Strien E. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol*, 55: 85–97

Van Loon L.C. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol*, 119: 243-254

Vance C.P., Kirk T.K., Sherwood R.T. (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annu Rev Phytopathol*: 18, 259–28

Vandenbroucke K., Robbens S., Vandepoele K., Inzé D., Van de Peer Y., Van Breusegem F. (2008). Hydrogen Peroxide-Induced Gene Expression across

Kingdoms: A Comparative Analysis. *Mol Biol Evol*, 25: 507-516

Vanholme R., Demedts B., Morreel K., Ralph J., Boerjan W. (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol*, 153(3): 895-905

Varricchio P., Falabella P., Sordetti R., Graziani F., Malva C., Pennacchio F. (1999). *Cardiochiles nigriceps* polydnavirus: molecular characterization and gene expression in parasitized *Heliothis virescens* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 1087-1096

Vleeshouwers V.G., Rietman H., Krenek P., Champouret N., Young C., Oh S.K., Wang M., Bouwmeester K., Vosman B., Visser R.G., Jacobsen E., Govers F., Kamoun S., Van der Vossen E.A. (2008). Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes. *PLoS ONE* 3: e2875

Webb B.A. (1998). Polydnavirus biology, genome structure, and evolution. In *The Insect Viruses*, ed. LK Miller, LA Balls, New York: Plenum, pp. 105-39

Webb B.A. e Strand M.R. (2005). The biology and genomics of polydnaviruses. In: Gilbert LI, K latrou K, Gill SS (eds), *Comprehensive molecular insect science*, Vol. 6, Elsevier, San Diego: 323-360

Webb B.A., Beckage N.E., Hayakawa Y., Krell P.J., Lanzrein B., Stoltz D.B., Strand M.R., Summers M.D. (2000). Family polydnaviridae. In M.H.V. van 4 Regenmortel (ed.). *Virus Taxonomy. Seventh report of the International 5 Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, CA

Wirthmueller L., Zhang Y., Jones J.D.G., Parker J.E. (2007). Nuclear Accumulation of the Arabidopsis Immune Receptor RPS4 Is Necessary for Triggering EDS1-Dependent Defense. *Curr Biol*, 17: 2023-2029

Wu G., Shortt B.J., Lawrence E.B., Leo N.J., Fitzsimmons K.C., Levine E.B., Raskin I., Shah D.M. (1997). Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. *Plant Physiol*, 115: 427-435

Xiang T., Zong N., Zou Y., Wu Y., Zhang J., Xing W., Li Y., Tang X., Zhu L., Chai J., Zhou J. M. (2008). *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr Biol*, 18: 74-80

Yan J., Wang J., Zhang H. (2002). An ankyrin repeat-containing protein plays a role in both disease resistance and antioxidation metabolism. *Plant J*, 29:193-202

Yeh K.W., Chen J.C., Lin M.I., Chen Y.M., Lin C.Y. (1997). Functional activity of sporamin from sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.): a tuber storage protein with trypsin inhibitory activity. *Plant Mol Biol*, 33(3): 565-70

Zavala J.A., Patankar A.G., Gase K., Hui D., Baldwin I.T. (2004). Manipulation of endogenous trypsin proteinase inhibitor production in *Nicotiana attenuata* demonstrates their function as antiherbivore defenses. *P Physiology*, 134: 1181-1190

Zhang H., Li X., Zhang Y., Kuppu S., Shen G. (2010). Is AKR2A an essential molecular chaperone for a class of membrane-bound proteins in plants? *Plant Signal Behav*, 5(11): 1520-2

Zhang X.F., Li J., Qi G., Wen K., Lu J., Zhao X. (2011). Insecticidal effect of recombinant endophytic bacterium containing *Pinellia ternata* agglutinin against white backed planthopper, *Sogatella furcifera*. *Crop Protection*, 30: 1478-1484

Zhang Y., Xu S., Ding P., Wang D., Cheng Y.T., He J., Gao M., Xu F., Li Y., Zhu Z., Li X., Zhang Y. (2010). Control of salicylic acid synthesis and systemic acquired resistance by two members of a plant-specific family of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 18220–18225

Zhao Q. e Dixon R.A. (2011). Transcriptional networks for lignin biosynthesis: more complex than we thought?. *Trend Plant Sci*, 16 (4): 227-233

Zipfel C., Kunze G., Chinchilla D., Caniard A., Jones J.D.G., Boller T., Felix G. (2006). Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts *Agrobacterium*-Mediated Transformation. *Cell*, 125(4): 749-760

Zipfel C., Robatzek S., Navarro L., Oakeley E.J., Jones J.D., Felix G. and Boller T. (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, 428: 764–767

APPENDICE

Tabella A1 : Geni overespressi con Fold Change (FC) superiore a 2 nelle piante NN+cap
AGI: *Gene Index Accession number*, TC: *tentative consensus*, FC: *fold change*.

AGI	TC	FC	Descrizione della sequenza
<i>Risposte di difesa</i>			
AT2G16430	TC10888	2,10	purple acid phosphatase
AT2G02100	TC8608	2,20	pcp17c2/Defensin similar 1.2
AT5G24090	TC13225	2,30	acidic endochitinase
AT1G17860	TC5070	2,50	kunitz type trypsin and protease inhibitor
AT4G37050	TC12824	2,70	patatin-like protein
AT3G12500	TC4041	2,80	basic endochitinase
AT3G57470	TC10576	3,10	peptidase m16 family protein
AT3G04720	TC8185	3,10	hevein-like protein
AT5G53110	TC13808	3,30	Protein
AT4G20380	TC6356	3,40	zinc finger protein lsd1
AT1G19610	TC12331	3,60	defensin-like protein 19
AT1G05760	TC10259	4,50	rtm1 protein
AT2G14580	TC6659	6,10	pathogenesis-related protein 1
<i>Stress ossidativo</i>			
AT1G48300	TC9501	2,00	soluble diacylglycerol acyltransferase
AT1G07400	TC6150	2,00	small heat shock protein
AT1G60420	TC7488	2,10	nucleoredoxin 1
AT3G48290	TC4413	2,20	cytochrome p450-like protein
AT1G50970	TC12592	2,60	heat intolerant 1 protein
AT1G07890	TC4086	2,60	l-ascorbate peroxidase
AT1G34210	TC13224	2,90	somatic embryogenesis receptor kinase
AT4G36090	TC11898	3,00	2og-fe oxygenase family protein
AT4G02340	TC7691	3,10	Protein
AT3G51790	TC7584	3,70	cytochrome c-type biogenesis protein
AT5G43750	TC5857	4,60	nad h dehydrogenase 18
<i>Modificazione della parete cellulare</i>			
AT2G32990	TC7109	2,60	glycosyl hydrolase family 9
AT3G14310	TC9838	3,50	pectin methylesterase
AT3G05460	TC4705	4,70	cysteine-rich protein
AT4G16260	TC4026	5,50	beta- glucanase
<i>Stress abiotici</i>			
AT5G60660	TC12751	2,20	mip pip sub family
AT5G52910	TC9927	2,40	timeless family protein
AT4G38840	TC10353	3,00	saur family protein
<i>Fattori trascrizionali</i>			
AT5G20150	TC11629	3,10	spx domain-containing protein
AT5G13180	TC7486	3,60	nac domain protein
AT4G10840	TC9327	3,90	tetratricopeptide repeat domain-protein
<i>Fotosintesi</i>			
AT1G45474	TC12641	2,10	photosystem i light harvesting complex protein 5
AT1G79040	TC11423	2,10	photosystem ii subunit r
AT5G54270	TC4153	2,80	light-harvesting complex ii protein lhcb3
AT1G54460	TC5574	4,00	tpx2 (targeting protein for xklp2) protein family

AGI	TC	FC	Descrizione della sequenza
<i>Trascrizione</i>			
AT1G09200	TC7669	2,00	histone h3
AT5G59870	TC7298	2,10	histone h2a
AT2G14140	TC12221	2,20	gene product
AT1G32700	TC7207	2,20	platz transcription factor domain-containing protein
AT3G27360	TC9616	2,80	histone h3
AT3G15010	TC10208	2,90	rna recognition motif-containing protein
AT2G01220	TC13366	3,20	nucleotidyl transferase domain-containing protein
AT2G03870	TC8995	3,50	Protein
AT2G26460	TC12082	3,70	splicing factor
AT2G26160	TC8148	4,20	f-box protein
<i>Trasporto intracellulare</i>			
AT2G16980	TC7808	2,10	major facilitator protein
AT2G40060	TC5190	2,20	clathrin light chain protein
AT1G60970	TC9053	3,60	clathrin adaptor complex small chain family protein
<i>Processi biologici: metabolismo</i>			
AT5G38410	TC6234	2,10	ribulose biphosphate small subunit
AT4G33030	TC13445	2,10	udp-sulfoquinovose synthase
AT5G17310	TC4840	2,10	udp-glucose pyrophosphorylase
AT5G66530	TC10903	2,10	aldose 1-epimerase family protein
AT1G55320	TC9532	2,20	acyl-activating enzyme 18
AT1G04850	TC7483	2,20	ubiquitin-associated ts-n domain-containing protein
AT4G13510	TC10827	2,30	ammonium transporter
AT2G22590	TC6787	2,30	Protein
AT3G56240	TC9072	2,40	copper chaperone
AT3G02870	TC8768	2,40	inositol-phosphate phosphatase
AT5G58710	TC5865	2,50	Cyclophilin
AT5G53340	TC11379	2,70	beta- -galactosyltransferase 11
AT1G52360	TC7780	3,00	coatomer subunit beta -3
AT1G67250	TC9521	3,40	proteasome maturation factor ump1 family protein
AT5G54160	TC4204	3,48	Caffeato 3-O-methyltransferase 1
AT1G08110	TC11075	3,90	lactoylglutathione lyase
<i>Non caratterizzate</i>			
AT3G08850	TC11855	2,00	uncharacterized protein
AT3G17780	TC7613	2,20	Protein
AT1G25275	TC9898	2,20	uncharacterized protein
AT1G79090	TC6379	2,40	Protein
AT5G16660	TC12595	2,50	uncharacterized protein
AT5G49940	TC8298	2,60	-like protein 2
AT4G30996	TC9365	2,60	uncharacterized protein
AT1G56260	TC12651	2,60	uncharacterized protein
AT2G05520	TC8445	3,00	---NA---
AT2G31130	TC8038	3,10	Protein
AT2G35330	TC12434	3,50	Protein
AT5G60680	TC6337	3,70	uncharacterized protein
AT2G29020	TC9915	4,70	rab5-interacting family protein
AT3G29130	TC13050	4,70	uncharacterized protein
AT1G67140	TC13709	5,00	uncharacterized protein

Tabella A2 : Geni down-regolati con Fold Change (FC) inferiore a 0,5 nelle piante NN+cap

AGI	TC	FC	Descrizione della sequenza
<i>Risposte di difesa</i>			
AT1G09750	TC5658	0,38	aspartyl protease
AT2G38900	TC10289	0,41	protease inhibitor
AT1G19660	TC4508	0,45	bifunctional nuclease in basal defense response1
AT1G70850	TC6062	0,49	mlp-like protein 28
<i>Risposta a stress ossidativo</i>			
AT1G21140	TC6892	0,38	vacuolar iron transporter-like protein
AT4G35090	TC13717	0,41	Catalase
AT5G38710	TC4467	0,44	proline dehydrogenase
AT3G13390	TC6494	0,45	protein sku5-like 11
AT2G19940	TC5023	0,48	n-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase
<i>Stress abiotici</i>			
AT1G56220	TC7868	0,08	dormancy auxin associated protein
AT1G28330	TC6005	0,15	dormancy-associated 1
AT5G24860	TC8347	0,26	Protein
AT1G16880	TC13456	0,44	uridylyltransferase-related protein
AT3G28917	TC7518	0,45	mini zinc finger 2
AT5G66040	TC4573	0,49	senescence-associated protein
AT2G39730	TC11434	0,50	ribulose biphosphate carboxylase oxyg activase
<i>Processi biologici</i>			
AT3G13750	TC11258	0,18	beta galactosidase 1
AT2G45180	TC7757	0,22	proline-rich protein
AT4G13830	TC8960	0,31	-like protein
AT1G14900	TC8206	0,42	high mobility group family
AT4G18501	TC9590	0,43	uncharacterized protein
AT4G36040	TC7321	0,43	Protein
AT1G49540	TC9008	0,47	elongator protein 2
AT2G10940	TC12053	0,49	at2g10940-like protein
AT4G34160	TC13403	0,50	cyclin delta-3
<i>Non caratterizzate</i>			
AT4G27450	TC6023	0,17	Protein
AT3G14980	TC11694	0,39	uncharacterized protein
AT1G15670	TC4856	0,40	f-box kelch-repeat protein
AT3G03150	TC6668	0,46	seed specific protein bn15d1b
AT3G23255	TC9173	0,50	uncharacterized protein

Tabella A3 : Geni overespressi con FC superiore a 2 nel genotipo Sp-ank-kdel 1+cap

AGI	TC	FC	Descrizione della sequenza
<i>Risposte di difesa</i>			
AT1G17860	TC5310	2,11	kunitz type trypsin and proteas inhibitor
AT1G70850	TC6062	2,12	mlp-like protein 28-Putative PR-10 type
AT3G04720	TC8185	2,13	hevein-like protein
AT4G11650	TC4238	2,15	osmotin precursor
AT2G38900	TC10289	2,25	protease inhibitor PIN1
AT3G57240	TC4059	2,96	beta- -glucanase
AT2G14580	TC9453	3,73	Pathogenesis-related protein 1A precursor
AT2G14580	TC6659	4,35	pathogenesis-related protein 1
<i>Risposta a stress ossidativo</i>			
AT3G56460	TC9940	2,01	quinone reductase-like protein
AT2G05710	TC4545	2,85	aconitate hydratase 2
<i>Modificazioni della parete cellulare</i>			
AT2G45180	TC7757	2,99	proline-rich protein
<i>Trasporto intracellulare</i>			
AT1G20925	TC5854	2,63	auxin efflux carrier-like protein
<i>Fattore trascrizionale</i>			
AT1G32700	TC7116	2,56	platz transcription factor
<i>Risposta a stress abiotico</i>			
AT5G22060	TC10691	2,01	dnaj protein homolog atj3
<i>Non caratterizzata</i>			
AT3G06790	TC12817	2,78	dag protein

Tabella A4: Geni down-regolati con FC inferiore a 0,5 nel genotipo Sp-ank-kdel 1

AGI	TC	FC	Descrizione della sequenza
<i>Risposte di difesa</i>			
AT5G53110	TC13808	0,24	protein
AT2G02100	TC8608	0,26	pcp17c2
AT4G20380	TC6356	0,28	zinc finger protein lsd1
AT2G42010	TC10766	0,29	phospholipase d
AT1G05760	TC10259	0,30	rtm1 protein
AT1G19610	TC12331	0,33	defensin-like protein 19
AT4G37050	TC12824	0,40	patatin-like protein
AT3G57470	TC10576	0,40	peptidase m16 family protein
AT2G16430	TC10888	0,43	purple acid phosphatase
AT1G55380	TC12764	0,44	cysteine histidine-rich c1 domain-containing protein (CHORDs domains)
AT1G17860	TC5070	0,45	kunitz type trypsin and protease inhibitor domain-containing protein
AT2G22240	TC4087	0,48	inositol-3-phosphate synthase
<i>Stress abiotici</i>			
AT2G38310	TC5184	0,38	protein
AT2G42430	TC11556	0,45	protein
AT4G02380	TC10859	0,48	senescence-associated protein
<i>Modificazioni della parete cellulare</i>			
AT2G32990	TC7109	0,38	glycosyl hydrolase family 9 :GH9
AT3G14310	TC9838	0,39	pectin methylesterase
AT3G05460	TC4705	0,41	mitochondria-associated cysteine-rich protein
AT2G34700	TC4425	0,43	arabinogalactan protein 31 AGP31
AT5G20940	TC10066	0,46	glycosyl hydrolase family protein
AT5G20950	TC10066	0,46	glycosyl hydrolase family protein
AT3G07820	TC4472	0,46	polygalacturonase-like protein
AT2G24450	TC4979	0,49	fasciclin-like arabinogalactan protein 3: FLA3
<i>Risposta a stress ossidativo</i>			
AT4G36090	TC11898	0,20	2og-fe oxygenase family protein
AT3G51790	TC7584	0,31	cytochrome c-type biogenesis protein
AT5G43750	TC5857	0,34	nad h dehydrogenase 18
<i>Fotosintesi</i>			
AT5G51250	TC155133	0,03	f-box kelch-repeat protein
AT1G54460	TC5574	0,35	tpx2 (targeting protein for xklp2) protein family
AT1G45474	TC12641	0,37	photosystem i light harvesting complex protein 5
<i>Trasduzione del segnale</i>			
AT5G45950	TC9476	0,29	gds1 esterase lipase
AT4G10840	TC9327	0,33	tetratricopeptide repeat domain-containing protein
AT5G13180	TC7486	0,33	nac domain ipr003441
AT2G29580	TC7442	0,42	zinc finger ccch domain-containing protein 25
AT2G40500	TC8090	0,43	protein kinase-like protein
AT5G59840	TC4437	0,44	gtp-binding protein ara-3

AT3G03860	TC4513	0,46	protein alfin-like 5
AT4G22070	TC11395	0,49	wrky dna-binding protein 31

AGI	TC	FC	Descrizione della sequenza
<i>Trasporto intracellulare</i>			
AT1G60970	TC9053	0,29	clathrin adaptor complex small chain family protein
AT2G40060	TC5190	0,43	clathrin light chain protein
<i>Metabolismo primario, secondario e proteico</i>			
AT2G05990	TC4019	0,49	enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase
AT1G08110	TC11075	0,35	lactoylglutathione lyase
AT1G52360	TC7780	0,42	coatomer subunit beta -3
AT5G53340	TC11379	0,37	beta- -galactosyltransferase 11
AT1G67250	TC9521	0,4	proteasome maturation factor ump1 family protein
AT1G04850	TC7483	0,49	ubiquitin-associated ts-n domain-containing protein
AT5G54160	TC4204	0,44	Caffeic 3-O-methyltransferase 1
AT3G63170	TC4088	0,46	chalcone isomerase
<i>Trascrizione</i>			
AT2G03870	TC8995	0,2	protein
AT2G26460	TC12082	0,29	splicing factor
AT2G26160	TC8148	0,36	f-box protein
AT2G01220	TC13366	0,37	nucleotidyl transferase domain-containing protein
AT3G15010	TC10208	0,49	rna recognition motif-containing protein
<i>Non caratterizzate</i>			
AT5G49940	TC8298	0,29	-like protein 2
AT3G17780	TC7613	0,37	protein
AT4G30996	TC9365	0,46	uncharacterized protein
AT1G67140	TC13709	0,28	
AT2G29020	TC9915	0,29	rab5-interacting family protein
AT2G44670	TC9524	0,30	uncharacterized protein
AT5G60680	TC6337	0,32	uncharacterized protein
AT3G29130	TC13050	0,34	uncharacterized protein
AT2G35330	TC12434	0,37	protein
AT2G31130	TC8038	0,44	protein
AT5G16660	TC12595	0,47	uncharacterized protein
AT3G07210	TC8336	0,48	uncharacterized protein
AT1G56260	TC12651	0,49	uncharacterized protein
AT3G07090	TC6513	0,49	protein
AT3G50170	TC13607	0,50	uncharacterized protein

Pubblicazioni:

Labriola M., **Famiglietti M.**, Fanti P., Falabella P., Woo S., Rao R. (2006). Study Of The Expression Of *Ank1*, An Ikb-Like Gene From The *Toxoneuron Nigriceps* Bracovirus, In Tobacco Plants 50° Annual Congress of Societa' Italiana Di Genetica Agraria - Ischia (Italy) - 10/14 September 2006

M. Labriola; **Famiglietti M.**; P. Varricchio; P. Fanti; P. Falabella R. Rao. (2007). Tnbvank1 protein expressed in Tobacco Plants Reduces the growth of *H. Virescens*. XXI National Congress of Entomology -Campobasso – 12/14 Giugno 2007

Varricchio P; Tortiglione C; **Famiglietti M.**; Labriola M. And R. Rao. (2007). Cell Localization Of An Ikb-Like Gene In Tobacco . 51° Annual Congress of Societa' Italiana Di Genetica Agraria – Riva Del Garda (Italy) -23/26 September 2007

Famiglietti M., Varricchio P, Terracciano I, Pennacchio F, Rao R (2008). Study of the effects of the expression of a viral Ik-B like protein on the tobacco defence 52° Annual Congress of Societa' Italiana Di Genetica Agraria – Padova (Italy) -14-17 September 2008

Soggiorni all'estero:

2009, giugno Wageningen, Dipartimento di ricerca Monsanto

Soggiorno in altri gruppi di ricerca italiani:

2008, maggio-giugno: Centro di Genomica vegetale dell'Università di Verona

XXI CONGRESSO NAZIONALE ITALIANO DI ENTOMOLOGIA
Campobasso 11-16 Giugno 2007

Sessione VIII Controllo biologico e biotecnologie entomologiche

LA PROTEINA TnBVank1 ESPRESSA IN PIANTE DI TABACCO RIDUCE L'ACCRESIMENTO PONDERALE DI LARVE DI *H. VIRESCENS*

M. Labriola¹, M. Famiglietti¹, P. Varricchio¹, P. Fanti², P. Falabella² & R. Rao¹

¹Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta dell'Ambiente e delle Produzioni Animali, Università di Napoli "Federico II", via Università 100, 80055 Portici

²Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie, Università della Basilicata, Campus di Macchia Romana, 85100 Potenza

Toxoneuron nigriceps è un Imenottero braconide endofago che si sviluppa a carico delle larve del Lepidottero *Heliothis virescens*. Le larve parassitizzate presentano alterazioni del sistema endocrino, della risposta immunitaria e dello sviluppo. Molte di queste patologie sono indotte da geni del polydnavirus simbionte, *T. nigriceps* (TnBV), che viene iniettato nell'ospite durante l'ovideposizione.

Il sequenziamento dell'intero genoma di TnBV ha evidenziato la presenza di 3 geni, denominati TnBVank1-3, che codificano proteine caratterizzate da un significativo livello di identità con proteine I κ B, inibitori dei fattori trascrizionali NF- κ B. Le proteine virali "IkB-like" identificate, però, presentano domini di anchirina più brevi e mancanodei domini che ne regolano la degradazione indotta da segnali extracellulari. Ciò fa in modo che tali proteine virali leghino stabilmente NF- κ B, impedendone la traslocazione nucleare e la conseguente attivazione di geni sotto il suo controllo trascrizionale, come dimostrato nel caso di TnBVank1 (Falabella *et al.*, 2007). Le caratteristiche molecolari del gene TnBVank1, ne hanno incoraggiato l'espressione in pianta, per verificarne l'eventuale attività insetticida. Le piante hanno infatti geni simili che sembrano essere coinvolti nella risposta all'attacco di patogeni. Piante di *Nicotiana tabacum* sono state trasformate per l'espressione costitutiva del gene virale TnBVank1 fuso al 3' con la sequenza del segnale di ritenzione nel reticolo endoplasmatico KDEL.

Le piante trasformate, caratterizzate tramite PCR e Western, esprimono la proteina virale che interagisce in parte con le proteine della pianta formando multimeri di vario peso molecolare. Foglie di piante transgeniche sono state utilizzate per alimentare larve di *Heliothis virescens*, delle quali è stato rilevato l'accrescimento ponderale e la mortalità durante i vari stadi dello sviluppo. I risultati ottenuti mostrano che le larve alimentate su foglie transgeniche subiscono un rallentamento dello sviluppo e hanno una mortalità superiore rispetto alle larve alimentate sulle piante controllo.

Parole chiave: Polydnavirus, IkB, biosaggi

Falabella P, Varricchio P, Provost B, Espagne E, Ferrarese R, Grimaldi A, de Eguileor M, Fimiani G, Ursini MV, Malva C, Drezen JM, Pennacchio F. Characterization of the IkB-like gene family in polydnaviruses associated with wasps belonging to different Braconid subfamilies.

J Gen Virol. 2007, 88: 92-104

STUDY OF THE EXPRESSION OF ANK1, AN IKB-LIKE GENE FROM *TOXONEURON NIGRICEPS* BRACOVIRUS IN TOBACCO PLANTS

M. LABRIOLA*, M. FAMIGLIETTI*, P. FANTI**, P. FALABELLA**, S. WOO***, R. RAO*

*) Department of Soil, Plant and Environmental Sciences, University of Naples
“Federico II”, Via Università 100, 80055 Portici, Italy

**) Department of Biology, Defense and Biotechnologies, University of Basilicata,
Campus di
Macchia Romana, 85100 Potenza, Italy

***) Department of Arboriculture, Botany and Plant Pathology, University of Naples
“Federico II”, Via Università 100, 80055 Portici, Italy

Polydnavirus, Ikb, Ankyrin, Nicotiana tabacum, plant defence

Wasp parasitoids have developed a wide range of host colonization strategies, all resulting in severe pathological syndromes in the parasitized hosts. The involvement of a complex array of physiological and molecular mechanisms in host-parasitoid associations offers interesting candidates, as new perspectives, for sources of genes with potential applications for plant pest control. *Toxoneuron nigriceps* is an endophagous parasitoid of tobacco budworm *Heliothis virescens*. This hymenopteran wasp is associated with a polydnavirus, *Toxoneuron nigriceps* Bracovirus (TnBV), that is injected in the host at the time of oviposition. It plays a key role in the disruption of the host immune reaction of parasitized larvae. The expression of the ankyrin gene (*Ank1*) appears to be directly involved in the suppression of the host immune response by interfering with the TNF/Toll pathway. The ANK1 protein has significant homology to insect and mammal Ikb proteins, molecules characterized by the presence of an ankyrin domain involved in protein-protein interactions. Plants also have similar genes that appear to be involved in the plant response to pathogen attack. In order to study the role of such genes in plant defence, *Nicotiana tabacum* was constitutively transformed with a TnBV *Ank1* gene fused to a sequence encoding for a myc peptide. Transformed plants were characterized by PCR and RT-PCR. Western analysis demonstrated a complex hybridization profile, with numerous bands of high molecular mass in addition to the expected band of 25 kDa, suggesting interactions among ANK1 and other cytoplasmic proteins.

Transgenic plants are presently being analysed in bioassays with the plant pathogen *Botrytis cinerea* and lepidoptera larvae. Moreover, microarray experiments are in progress on the same plants to assess transcriptomic modifications of defence proteins during pathogen interactions.

PLANT CELL LOCALIZATION OF *TnBVANK1*, AN IKB-LIKE GENE FROM *TOXONEURON NIGRICEPS* BRACOVIRUS

VARRICCHIO P.*, TORTIGLIONE C.***, FAMIGLIETTI M.*, LABRIOLA M.*, RAO R.*

*) Department of Soil, Plant, Environmental Sciences and Animal Production Science,
University of Naples “Federico II”, Via Università 100, 80055 Portici (Italy)

**) Institute of Cybernetics 'E. Caianiello' C.N.R., Via Campi Flegrei 34, Bldg 70, 80078
Pozzuoli, Naples (Italy)

IkB, Ankyrin, Nicotiana tabacum, immunolocalization

Toxoneuron nigriceps Bracovirus TnBV is a polydnavirus associated with *Toxoneuron nigriceps* an endophagous parasitoid of larval stages of the tobacco budworm *Heliothis virescens* that injects the viral DNA into the host with the egg at the ovideposition. Viral genes play an important role in the suppression of the host immune reaction and in the development of a severe alteration in the hormonal balance of parasitized larvae. Viral genomes have been sequenced and evidenced the presence of a gene family characterized by the presence of two ankyrin repeats showing high similarity to the IkB-like proteins involved in NfκB signalling pathway (Falabella et al., 2007). These proteins play a key role in the negative regulation of immune system in mammals and insects. The conservation in planta of a IkB-NFκB like pathway and its possible involvement in plant response to pathogen attack, supported the expression of one of the gene of this family, TnBVank1 in tobacco in order to study its possible role in plant defence. Transgenic plants constitutively expressing TnBVank1 gene were fully characterized by RT-PCR and western blotting which confirmed the expression of the recombinant protein often complexed with other proteins through bounds possibly mediated by the ankyrin domains. Here we report on the cellular localization of the recombinant protein in transgenic tobacco protoplasts and discuss its implications with defence mechanisms.

STUDY OF THE EFFECTS OF THE EXPRESSION OF A VIRAL I κ B LIKE PROTEIN ON TOBACCO DEFENSE

FAMIGLIETTI M., VARRICCHIO P., TERRACCIANO P., LABRIOLA M., RAO R.
Department of Soil, Plant, Environmental and Animal Production Sciences, University of Naples “Federico II”, Via Università 100, 80055 Portici (Italy)

I κ B, Nicotiana tabacum, plant defense, PR1

NF- κ B is involved in the regulation of several stress related cellular activities (Hoffmann, 2003; *Nature*: 426, 33). NF- κ B dimers are sequestered into the cytosol of unstressed cells through non-covalent interactions with a class of inhibitor proteins, called I κ Bs.

All members of I κ B family have ankyrin repeats, which bind to NF- κ B/Rel proteins and mask their nuclear localisation signal. The I κ B-NF κ B like pathway is conserved in plants where it is implicated in the defence response induced by pathogen infections (Kuhlmann M. *et al.*, 2003; *J Biol Chem*: 278, 8786). In order to study the impact of such a gene of plant defence we expressed in tobacco an I κ b- like gene, *TnBVank1*, isolated from a polydnavirus associated with *Toxoneuron nigriceps*, an endophagous parasitoid of larval stages of the tobacco budworm *Heliothis virescens* (Falabella P. *et al.*, 2007; *J Gen Virol* : 88, 92).

We have characterized transgenic plants by RT-PCR and western blotting which confirmed the expression of the recombinant protein often complexed with other proteins in interactions probably mediated by the ankyrin domains. Transgenic protoplast were used to immunolocalize the recombinant protein which appeared to be essentially linked to cellular membranes.

In order to evaluate the ability of transgenic plants to modify the expression of defensive genes, transformants were challenged with a fungal elicitor and analyzed for the expression of biotic stress related genes by microarray approach. A significant alteration of PR1 gene expression profile, confirmed by a quantitative Real Time PCR, was observed. These results suggest that the constitutive expression of the *TnBVank1* gene is associated with a modification of the tight control of the Nf κ B-like of tobacco plants.